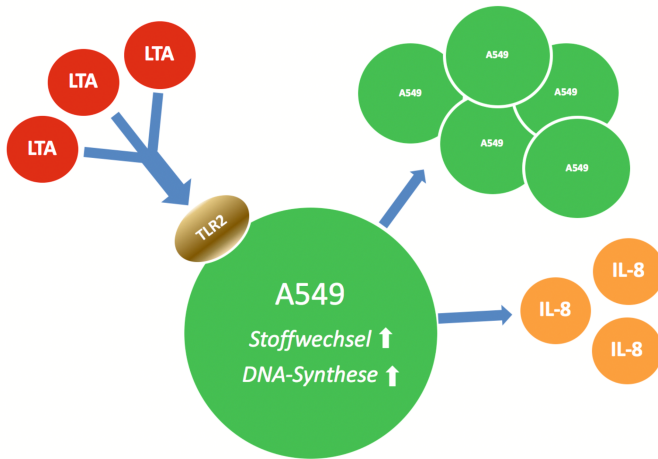


Einfluss von Lipoteichonsäuren von *Staphylococcus aureus* auf die Proliferation von NSCLC-Zelllinien.

Christian Philipp Reinert



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Einfluss von Lipoteichonsäuren von
Staphylococcus aureus auf die Proliferation
von NSCLC-Zelllinien**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Christian Philipp Reinert
aus Düsseldorf

Gießen 2016

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik und
Poliklinik IV/V der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Grimminger

Betreuerin: Dr. med. Katja Hattar

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Grandel
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Stefan Gattenlöhner

Tag der Disputation: 30.03.2017

Meinen Eltern in Dankbarkeit.

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC)	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Definition und Ätiologie	1
1.1.3	Klinik	2
1.1.4	Diagnostik und Stadieneinteilung	2
1.1.5	Therapie	3
1.1.6	Prognose	4
1.2	Die bakterielle Infektion als Komorbidität bei Patienten mit NSCLC	4
1.3	Pathogenitätsfaktoren von Staphylococcus aureus	6
1.4	Lipoteichonsäuren	7
1.5	Toll-like Rezeptoren	9
1.6	Interleukin-8	12
1.7	Fragestellung	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Verwendete Geräte	16
2.2	Verwendete Materialien	17
2.3	Verwendete Substanzen	17
2.4	Verwendete NSCLC-Zelllinien	19
2.5	Verwendete Software	20
2.6	Methodik	20
2.6.1	Zellkultur	20
2.6.2	Passagierung der Zellen	20
2.6.3	Proliferationsassays	21
2.6.3.1	Direkte Bestimmung der Proliferation durch Zellzählung im Casy® Cell Count	21
2.6.3.2	Indirekte Bestimmung der Proliferation durch MTT-Assay	23

2.6.3.3	Nicht-radioaktive Messung der DNA-Neusynthese durch BrdU-Assay .	25
2.6.4	Proliferationsbestimmung unter Einsatz von Antikörpern gegen TLR2, TLR4, und IL-8	26
2.6.5	IL-8-ELISA	27
2.6.6	Statistische Auswertung	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Proliferation der NSCLC-Zellen unter Inkubation mit LTA	32
3.2	Zellstoffwechselaktivität unter Inkubation mit LTA	34
3.3	Aktivität der DNA-Synthese unter Inkubation mit LTA	36
3.4	Einfluss von LTA auf die zelluläre Synthese von Interleukin-8	37
3.5	Blockade von TLR2, TLR4 und Interleukin-8 durch neutralisierende Antikörper – Effekt auf die Zellproliferation	38
3.6	Zelluläre Interleukin-8-Synthese unter Blockade von TLR2 und TLR4	42
4	Diskussion	43
4.1	LTA stimulieren die Aktivität der getesteten NSCLC-Zelllinien A549 und H226 und wirken proliferationssteigernd	44
4.2	Die Stimulation von A549 mit LTA induziert eine verstärkte IL-8-Synthese	47
4.3	Klinische Relevanz einer hochregulierten IL-8-Synthese für Patienten mit NSCLC – neue Therapieoptionen?	49
4.4	TLR2-abhängiger LTA-Effekt auf die zelluläre Proliferation und Zytokinsynthese	50
4.5	Autokrine Rolle von IL-8 bei der LTA-induzierten Zellproliferation – mögliche Mechanismen	52
4.6	Weitere mögliche Mechanismen der LTA-induzierten Proliferationssteigerung – potentielle Rolle der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, STAT3 und AP-1	54
4.7	Klinischer Ausblick	57
5	Zusammenfassung	58
6	Summary	59
7	Abkürzungsverzeichnis	60

8	Abbildungsverzeichnis	64
9	Literaturverzeichnis	65
10	Publikationen	89
11	Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation	90
12	Danksagung	91
13	Lebenslauf	92

1 Einleitung

1.1 Das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC)

1.1.1 Epidemiologie

Das Lungenkarzinom (LC) stellt mit einem Anteil von 25% an allen Karzinomen die weltweit häufigste Krebstodesursache sowohl bei Männern als auch bei Frauen dar (Siegel et al. 2014). Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungsfälle bei der weiblichen Bevölkerung hat sich seit 1980 in Deutschland nahezu verdreifacht, während bei Männern seit Beginn der 1990er-Jahre ein rückläufiger Trend altersstandardisierter Inzidenzraten zu verzeichnen ist. Die derzeitige Statistik lässt den Schluss zu, dass das LC den Brustkrebs als bisher häufigste weibliche Todesursache in Deutschland in den kommenden Jahren ablösen wird (Malvezzi et al. 2014; Robert-Koch-Institut 2013b). In Europa lassen sich etwa 80% der Erkrankungsfälle dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) zuordnen (McElnaym und Lim 2014). Das Adenokarzinom ist das weltweit häufigste diagnostizierte LC und seine Häufigkeit steigt weiterhin an (Landi et al. 2009; Devesa et al. 2005). Der mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen dem 68. und 69. Lebensjahr (Robert-Koch-Institut 2013b).

1.1.2 Definition und Ätiologie

Laut WHO werden LC definiert als vom respiratorischen Epithel aus entstehende Neoplasien (Travis et al. 2004). Sie können histologisch eingeteilt werden in kleinzellige LC (SCLC) und nicht-kleinzellige LC (NSCLC). Unter dem Begriff „NSCLC“ werden das Plattenepithelkarzinom, das Adenokarzinom (AdC) und das großzellige LC zusammengefasst (Travis et al. 2004).

Zu den wichtigsten Ursachen mit bis zu 60% bei Frauen bis zu 90% bei Männern zählt die aktive Zigarettenrauchinhalation (Robert-Koch-Institut 2013b; Brüske-Hohlfeld 2009; Alberg et al. 2013). Insbesondere Tabakkonsum scheint als Ursache eines AdC ursächlich zu sein (Travis et al. 2004; Bunn Jr, P. A. 2012). Es wird angenommen, dass eine veränderte Zigarettenzusammensetzung, vor allem der vermehrte Gebrauch von Filterzigaretten, Raucher zur tieferen Inhalation verleitet (Alberg et al. 2013; Hoffmann et al. 2001). Auf diese Weise gelangt mehr Tabakrauch in periphere Lungenanteile, was die Entstehung vorwiegend peripher lokalisierter LC wie das AdC und das großzellige LC fördern könnte (Govindan et al. 2006; Devesa et al. 2005). Gelingt eine erfolgreiche Nikotinkarenz, so fällt zwar die Mortalität im Laufe der Jahre leicht ab, erreicht jedoch nicht das Niveau eines Nicht-Rauchers (Bunn Jr, P. A. 2012). Die Rate an LC steigt in Regionen Afrikas und Asiens insbesondere aufgrund einer stabilen oder gar steigenden Prävalenz von Rauchern (Jemal et al. 2010). Berufliche und umweltbedingte

Karzinogene, wie z.B. Asbest, Arsen, Radon und polyzyklische Kohlenwasserstoffe, tragen ebenso wie vorbestehende Lungenerkrankungen und Passivrauchen zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko bei (Alberg et al. 2013; Jemal et al. 2011). Weiterhin werden Zusammenhänge zwischen dem Genotyp 5p15.33 und der Entwicklung eines Adenokarzinoms vermutet (Landi et al. 2009; Wang et al. 2008).

1.1.3 Klinik

Das Frühstadium der Erkrankung bleibt aufgrund unspezifischer Symptome häufig unerkannt (Spiro et al. 2007). Der Primärtumor verursacht etwa ein Drittel aller klinischen Symptome. Allgemeinsymptome wie Gewichtsverlust oder Schwächegefühl sind für das zweite Drittel aller Symptome verantwortlich. Das letzte Drittel bilden Metastasen, die zu spezifischen Symptomen führen (Goeckenjan et al. 2010). Die Patienten klagen über multiple Symptome, sowohl die Respiration als auch die körperliche Leistungsfähigkeit betreffend (Spiro et al. 2007). Als unspezifische Hinweise können eine zunehmende Kurzatmigkeit, persistierender Husten, Thoraxschmerz oder –engegefühl, Heiserkeit oder Stimmverlust auftreten (Travis et al. 2004). Hämoptysen treten meistens erst als Spätsymptom auf (Iyer et al. 2014). Viele Patienten werden außerdem durch rezidivierende Pneumonien auffällig (Travis et al. 2004).

1.1.4 Diagnostik und Stadieneinteilung

Die initiale Diagnose erfolgt zumeist durch Röntgen-Thorax-Untersuchung (Reck et al. 2013). Besteht ein Verdacht auf ein LC, wird eine CT-Untersuchung der Thoraxorgane durchgeführt (Goeckenjan et al. 2010). Zur Diagnosesicherung eines zentral lokalisierten Tumors erfolgt eine Bronchoskopie in Kombination mit transbronchialer Nadelaspiration. Die Trefferquote dieses Verfahrens kann durch die Durchführung endoskopischer Ultraschallverfahren wie „endobronchial ultrasound-guided needle aspiration“ (EBUS-NA) oder „endoscopic ultrasound-guided needle aspiration“ (EUS-NA) zusätzlich erhöht werden (Goeckenjan et al. 2010).

Die Evaluation des NSCLC erfolgt mittels klinischer sowie pathologischer Stagingverfahren (Tsim et al. 2010). Zum Staging des Primärtumors kommt die kontrastmittelverstärkte CT-Untersuchung von Thorax und Oberbauch zum Einsatz. Die Beurteilung mediastinaler Organe sowie der Brustwand erfolgt mittels Ultraschalluntersuchung des Thorax oder mittels Kernspintomographie. Zur Evaluation des Lymphknotenstatus werden Untersuchungsverfahren wie die FDG-PET/CT, der endobronchiale und ösophageale Ultraschall mit Nadelaspiration sowie die Mediastinoskopie durchgeführt. Um mögliche Fernmetastasen zu detektieren, werden zudem ein Ganzkörper-FDG-PET/CT und eine Kernspintomographie des Schädels

durchgeführt (Goeckenjan et al. 2010; Molina et al. 2008; Reck et al. 2013). Die Detektion eines möglicherweise begleitenden Pleuraergusses erfolgt durch transthorakale Ultraschalluntersuchung (Goeckenjan et al. 2010).

Seit 2009 wird das LC nach der von der UICC und AJCC veröffentlichten siebten Herausgabe der TNM-Klassifikation eingeteilt (Rami-Porta et al. 2009). Es wurden Änderungen in der Evaluation und Subklassifikation des T-Status sowie des M-Status vorgenommen, um eine bessere Korrelation mit statistischen Überlebensraten zu erzielen (Tsim et al. 2010).

1.1.5 Therapie

Die Wahl des geeigneten Therapiealgorithmus hängt primär vom Tumorstadium ab. Zudem muss berücksichtigt werden, ob und in welchem Ausmaß der Patient an Komorbiditäten leidet (Goeckenjan et al. 2010). Im Tumorstadium I, II und IIIa wird unter Voraussetzung einer ausreichenden kardio-pulmonalen Reserve die primär kurative Operation mit systematischer Lymphadenektomie angestrebt. Aufgrund nicht signifikant nachgewiesener Verlängerung der rezidivfreien- sowie Gesamtüberlebenszeit wird im Tumorstadium I und II bislang keine neoadjuvante Chemotherapie empfohlen. Einen positiven Einfluss auf die 5-Jahres-Überlebensrate ergab sich für Patienten im Stadium II bzw. IIIA₁/IIIA₂ und gutem Allgemeinzustand, die nach erfolgter R0-Resektion und systematischer Lymphknotendissektion eine adjuvante Chemotherapie mit einer cisplatinbasierten Kombination erhielten (McElnaym und Lim 2014). Eine adjuvante Strahlentherapie bzw. simultane adjuvante Chemoradiotherapie wird nach erfolgter R0-Resektion in den Tumorstadien I und II nicht empfohlen (Goeckenjan et al. 2010). Studien zeigten allerdings, dass Patienten mit Tumorstadium Ib und einer Tumorgroße von mehr als 4 bis 5 cm von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren können (Vansteenkiste et al. 2013; Strauss et al. 2008). Nicht operablen Patienten im Tumorstadium I/II wird hingegen eine definitive, lungenparenchymsparende Strahlentherapie empfohlen. Sofern Allgemeinzustand und Tumorausdehnung es zulassen, wird bei Patienten im Stadium IIIA₄/IIIB eine kombinierte Behandlung durch Strahlen- und Chemotherapie empfohlen (Goeckenjan et al. 2010). Eine cisplatinbasierte Kombinationschemotherapie sollte bei Patienten im Stadium IIIB/IV in gutem Allgemeinzustand erfolgen (Pignon et al. 2008).

In der personalisierten onkologischen Behandlung des NSCLC werden derzeit rezeptor- bzw. ligandenspezifische Therapieansätze untersucht und etabliert. So sind z.B. bereits aktivierende Mutationen des EGF-Rezeptors (EGFR) sowie die ELM4-ALK-Translokationsmutation bekannt und eröffnen Behandlungsmöglichkeiten mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (Reck et al. 2013; Lindeman et al. 2013). In mehr als 60% aller

NSCLC wird EGFR als Transmembranprotein mit zytoplasmatischer Kinaseaktivität exprimiert. EGFR spielt eine wichtige Rolle für die Regulation der Proliferation, Motilität, Differenzierung und des Überlebens von Tumorzellen. EGFR ist daher ein wichtiges therapeutisches Ziel von Tyrosinkinase-Inhibitoren (da Cunha Santos, G. et al. 2011). Bei positivem Mutationsstatus des EGFR sind Erlotinib, Gefitinib und Afatinib als Behandlungsoption zugelassen worden (Goeckenjan et al. 2010; Reck et al. 2014). Zusätzlich findet Bevacizumab zur platinbasierten Kombinationschemotherapie bei Patienten im Stadium IIIB/IV mit Nicht-Plattenepithelkarzinom und gutem Allgemeinzustand Anwendung (Goeckenjan et al. 2010). Des Weiteren finden seit Kurzem immuntherapeutische Ansätze, wie PD1-Inhibitoren in der Therapie des NSCLC Anwendung (Gettinger et al. 2015). Tabakrauch wirkt sich durch Beeinflussung des Medikamentenmetabolismus negativ auf die Effektivität des kompetitiven EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitors Erlotinib aus. Weiterhin gilt Rauchen bei radiotherapeutisch behandelten Patienten als Risikofaktor für eine Strahlenpneumonitis oder für pulmonale Infektionen während der Strahlentherapie (Andreas et al. 2013).

1.1.6 Prognose

Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit NSCLC beträgt 10-15% (Spiro et al. 2007; Molina et al. 2008). In einer Studie von Tibaldi et al. zeigte sich, dass prätherapeutisch erhöhte Leukozytenzahlen im Blut bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC (Stadium IIIB und IV) mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Tibaldi et al. 2008). Ebenso beobachteten Kasuga et al., dass eine tumor-assoziierte Leukozytose mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten verbunden ist (Kasuga et al. 2001).

1.2 Die bakterielle Infektion als Komorbidität bei Patienten mit NSCLC

Etwa 25% aller Krebserkrankungen werden mit chronischen Entzündungen bzw. Infektionen in Verbindung gebracht (Huang et al. 2014, Hussain und Harris 2007). Die Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH) schätzt die Gesamtzahl nosokomialer Infektionen bundesweit auf eine Million pro Jahr (Walger et al. 2013). Neben Harnwegsinfektionen (22,4%) und postoperativen Wundinfektionen (24,7%) stellen Infektionen der unteren Atemwege mit einem Anteil von 21,5% die am häufigsten beobachteten Infektionen dar. Regelmäßig leiden LC-Patienten an pulmonalen Infektionen, die das mediane Überleben zusätzlich einschränken (Perlin et al. 1990; Berghmans et al. 2003). Besonders immunsupprimierte Patienten zeigen eine höhere Morbidität und Mortalität bei pulmonalen Infektionen als bei Infektionen anderer Lokalisation (Rolston, K. V. I. 2001). Fokale pulmonale Infektionsherde sind oftmals Folge von Atemwegsobstruktionen, welche zu Atelektasen und poststenotischen

Pneumonien führen können. Durch den wachsenden Tumor kommt es zu einem vollständigen oder unvollständigen Verschluss eines Bronchus. Bei Progression ist auch die Entstehung von Empyemen oder Abszessen möglich. Darüber hinaus sind Tumornekrosehöhlen oftmals Entstehungsorte von Infektionen (Rolston, K. V. I. 2001). Treten im Zuge eines LC Hirnmetastasen auf, kann bei betroffenen Patienten der Schluckreflex eingeschränkt sein, was zu Aspirationspneumonien führen kann. Auch eine strahlungsbedingte Schädigung der Zilien im Respirationstrakt kann rezidivierende Aspirationen begünstigen (Rolston, K. V. I. 2001). Weiterhin stellt ein chirurgischer Eingriff zur Therapie des NSCLC einen Risikofaktor für eine postoperative Pneumonie dar (Belda et al. 2005). In einer prospektiven Studie von Putinati et al. zeigten sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen histologischen Zelltypen des LC und dem Auftreten einer Infektion des Respirationstraktes (Putinati et al. 1994). Allerdings wird eine stärkere Assoziation zwischen Pneumocystis-Infektionen und dem SCLC vermutet (de la Horra, C. et al. 2004). Das tracheobronchiale System gehört zu den am häufigsten betroffenen Regionen, in denen Infektionen bei LC-Patienten beobachtet wurden (Berghmans et al. 2003). Berghmans et al. stellten in ihrer Studie weiterhin fest, dass 94 von 244 an Infektionen leidenden Patienten mit LC an einer Pneumonie litten und 136 Patienten an einer Bronchitis. Gramnegative Bakterien stellten mit einem Anteil von 64% die häufigsten Erreger dar, gefolgt von grampositiven Bakterien (25%) und Pilzen (8%). Wurden allein die in Blutkulturen gefundenen Erreger untersucht, so fanden sich am häufigsten grampositive Bakterien (Berghmans et al. 2003). *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* waren die am häufigsten gefundenen grampositiven Keime, während *Hämophilus influenzae* sowie *Escherichia coli* die häufigsten gramnegativen Erreger darstellten (Berghmans et al. 2003). Immunsupprimierte Patienten und Patienten mit multiplen Risikofaktoren sind oftmals von mehreren pathogenen Erregern gleichzeitig betroffen (Rolston, K. V. I. 2001). Eine verminderte Immunabwehr durch Neutropenie tritt gehäuft bei Patienten auf, die mit Chemotherapeutika behandelt werden (Grossi und Tiseo 2006). Es zeigte sich, dass eine Langzeitbehandlung mit Clarithromycin bei NSCLC-Patienten lebensverlängernd ist (Sakamoto et al. 2001).

Chronische Inflammation wird vor allem aufgrund der Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen, die zu DNA-Schäden und Mutationen von Protoonkogenen führen, mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht (Hussain et al. 2003). K-ras Mutationen kommen in etwa 30-50% aller AdC der Lunge vor (Johnson et al. 2001). Die Aktivierung von k-ras in bronchialen Epithelzellen führt zu einer inflammatorischen Antwort durch Infiltration von Neutrophilen und alveolären Makrophagen (Ji et al. 2006). Weiterhin wird durch das Onkogen Ras die Synthese von IL-8 hochreguliert (Sparmann und Bar-Sagi 2004).

Zusammenhänge zwischen Tumorgenese und entzündlichen Geschehen durch bakterielle Infektion sind bereits bekannt. Eine chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* erhöht das Risiko, an einem Magenkarzinom (Correa und Houghton 2007; Chiba et al. 2008) oder MALT-Lymphom (Montalban et al. 2005) zu erkranken. Auch das kolorektale Karzinom tritt gehäuft bei Patienten auf, die mit *Streptococcus infantarius* infiziert sind (Biarc et al. 2004) oder an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen leiden (Itzkowitz und Yio 2004). Eine parasitäre Infektion mit *Schistosomiasis haematobium* erhöht die Wahrscheinlichkeit für Blasenkrebs (Malla et al. 2005), chronische virale Infektionen mit HBV und HCV sind mit dem hepatozellulären Karzinom assoziiert (Pujol und Devesa 2005). Diskutiert wird ein kausaler Zusammenhang zwischen Chlamydieninfektionen und LC (Zhan et al. 2011; Littman et al. 2005; Smith et al. 2008).

1.3 Pathogenitätsfaktoren von *Staphylococcus aureus*

Die wachsende Anzahl nosokomialer Infektionen sowie weltweit zunehmende Resistenzen gegenüber Antibiotika machen insbesondere *Staphylococcus aureus* zu einem relevanten pathogenen Erreger (Tilahun et al. 2014). Mit einem Anteil von 13,3% gehört er zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen in Deutschland (Robert-Koch-Institut 2012). *Staphylococcus aureus* ist zudem der häufigste multiresistente Keim in deutschen Krankenhäusern (Robert-Koch-Institut 2013a). Vor allem in den USA stellt MRSA zunehmend ein Problem dar, allein im Jahre 2005 starben in den Vereinigten Staaten mehr Menschen an den Folgen einer MRSA-Infektion als an AIDS und Tuberkulose zusammen (Boucher und Corey 2008). Während gesunde Menschen auch asymptomatisch mit *Staphylococcus aureus* besiedelt sein können, kann der Erreger harmlose Hautinfektionen bis lebensbedrohliche Erkrankungen wie tief sitzende Abszesse, Osteomyelitis, Endokarditis, Sepsis und das toxic shock syndrome (TSS) verursachen (Tilahun et al. 2014). Zudem werden Pneumonien durch Infektion mit *Staphylococcus aureus* ausgelöst (Kallen et al. 2009). Getunnelte zentralvenöse Katheter, wie sie bei einem großen Anteil neu hämodialysepflichtiger Patienten eingesetzt werden, sind innerhalb kurzer Zeit mit einem Biofilm aus grampositiven Erregern wie *Staphylococcus aureus* besiedelt. Dies führt zu rezidivierenden Infektionen und Entzündungen, weshalb Sepsis eine der Haupttodesursachen bei Dialysepatienten ist (Collins et al. 2012).

Zahlreiche Toxine wie Exfoliatin, Enterotoxine, α -Toxin, Peptidoglykane, Lipoproteine und Lipoteichonsäuren sind für die Virulenz dieses Erregers verantwortlich (Dinges et al. 2000; Caiazza und O'Toole 2003; Wardenburg et al. 2007; Pietrocola et al. 2011).

1.4 Lipoteichonsäuren

Neben Peptidoglykanen, Lipoproteinen und zellwandständigen Teichonsäuren sind Lipoteichonsäuren (LTA) Bestandteil der Zellmembran grampositiver Bakterien (Gisch et al. 2013). Ebenso wie die von gramnegativen Bakterien stammenden Lipopolysaccharide (LPS) lassen sich LTA den sog. pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) zuordnen (Mitchell et al. 2007). Unter Einsatz des β -Lactam-Antibiotikums Flucloxacillin sowie des Gyrase-Inhibitors Ciprofloxacin zeigte sich eine verstärkte LTA-Freisetzung von *Staphylococcus aureus* (Lotz et al. 2006). LTA sind Polymere aus Glycerol und Ribitol enthaltenden Polyhydroxyalkanen und Phosphorsäure, welche Einheiten aus Phosphodiester bilden. Ihre Basisstruktur besteht aus löslichen Polymeren, die an einen Membrananker gebunden sind und das äußere Blatt der Plasmamembran bedecken (Schneewind und Missiakas 2014). Der Membrananker besteht aus einem im bakteriellen Zytoplasma produzierten Glykolipid (diglucosyl-diacylglycerol [Glc2-DAG]) (Grundling und Schneewind 2007). Anhand ihrer chemischen Struktur können vier verschiedene Typen von LTA charakterisiert werden (s. Abb.1).

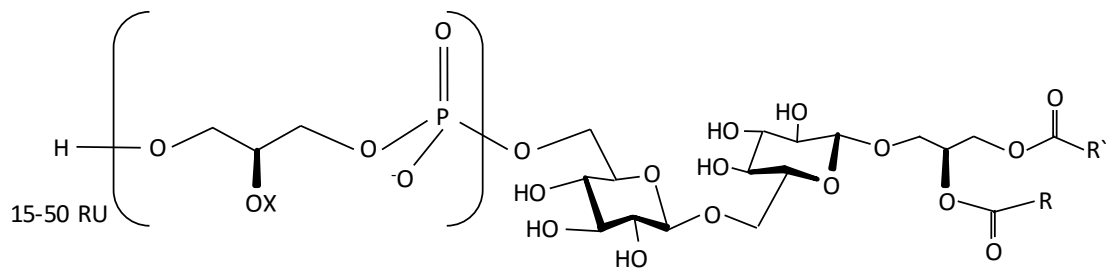


Abb. 1: Strukturformel von LTA Typ I (*Staphylococcus aureus*).

Modifiziert nach Schneewind und Missiakas (2014).

LTA führen im Organismus zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen des angeborenen Immunsystems (Hoogerwerf et al. 2008). Die durch Lysozym, kationische bakterizide Peptide, Phospholipase A₂, Elastase, Cathepsin oder β -Lactam-Antibiotika ausgelöste Bakteriolyse führt zur Freisetzung von LTA (s. Abb.2) (Ginsburg 2002; van Langevelde et al. 1998). In einer Studie von Xing et al. wurde beschrieben, dass sowohl LTA (50-300 ng/ml) als auch Peptidoglykane zu einer gesteigerten Permeabilität von Endothelzellen führen, was eine dysfunktionale Lungenbarriere zur Folge hat (Xing et al. 2011).

LTA erleichtern sowohl die Bindung des Bakteriums an Zellen als auch ihre Ausbreitung und ihr Eindringen ins Gewebe. Ähnlich wie LPS scheinen sie mit CD14 zu interagieren,

wodurch es zur Aktivierung von NF- κ B und letztlich zur Zytokinproduktion kommt (Ginsburg 2002).

Weiterhin ließ sich unter LTA-Inkubation eine verstärkte Signaltransduktion über TLR2 nachweisen (Schwandner et al. 1999). An die Zelloberfläche gebundene LTA können mit Antikörpern und Komplementfaktoren interagieren, um chemotaktische Faktoren zu bilden und eine unspezifische Immunreaktion hervorzurufen (Ginsburg 2002). In einem tierexperimentellen Modell an Mäusen zeigten von Aulock et al., dass durch intranasale Applikation von LTA polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) und Makrophagen in die Lunge infiltrieren. Zudem wurde die Freisetzung proinflammatorischer Faktoren wie LTB₄, IL-8, C5a, MCP-1 und G-CSF gemessen (Aulock et al. 2003).

Auch Leemans et al. konnten in einer tierexperimentellen Studie nachweisen, dass die intranasale Applikation von LTA und Peptidoglykanen zu einer akuten Entzündungsreaktion der Lunge durch Einwanderung von PMN und Produktion von Chemokinen und Zytokinen führen (Leemans et al. 2002). Diese Ergebnisse konnten in einer von Hoogerwerf et al. an männlichen Testpersonen durchgeführten Studie bestätigt werden (Hoogerwerf et al. 2008). Da für Experimente eingesetzte LTA durch frühere Herstellungsmethoden regelmäßig mit LPS kontaminiert waren, entwickelten Morath et al. eine neue Methode, aufbereitete (sog. purified) LTA mit einer niedrigeren Temperatur zu produzieren und die biologische Aktivität zu erhalten (Morath S. et al. 2001).

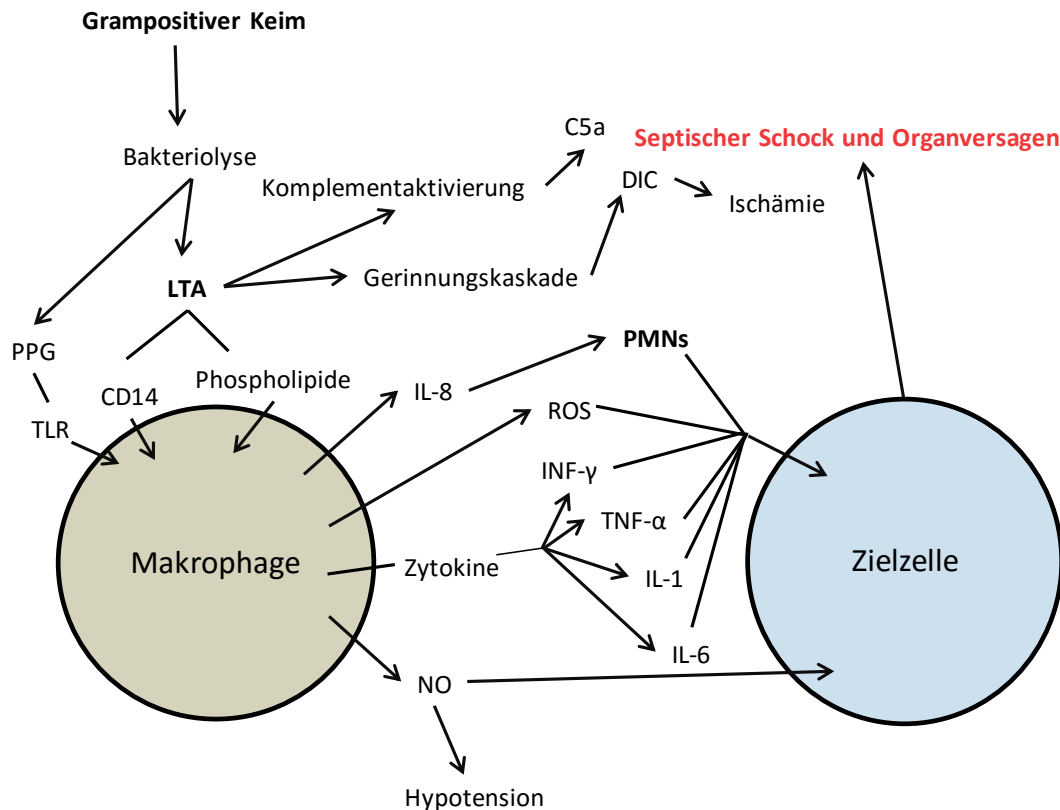


Abb. 2: Rolle der LTA in der Pathophysiologie von Entzündung, Gewebeschaden und postinfektiösen Spätfolgen. Modifiziert nach Ginsburg (2002).

CD: cluster of differentiation ; DIC: disseminated intravascular coagulation ; INF γ : interferon- γ ; NO: nitric oxide ; PMN: polymorphonuclear cells ; PPG: peptidoglycan ; ROS: reactive oxygen species ; TNF- α : tumor necrosis factor alpha

1.5 Toll-like Rezeptoren

Als wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems erkennen Toll-like Rezeptoren (TLR) ebenso wie Nod-like Rezeptoren (NLR) (Kent und Blander 2014) spezifische Moleküle, PAMPs sowie die als danger-associated molecular patterns (DAMPs) bezeichneten endogenen Liganden (Mitchell et al. 2007), was zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt (Pinto et al. 2011). TLR sind sowohl auf der zellulären Plasmamembran als auch in endosomalen bzw. lysosomalen Organellen lokalisiert (Pinto et al. 2011). Als Typ-1-Transmembranglykoprotein-Rezeptoren bestehen sie aus einer extrazellulären und einer intrazellulären Domäne (s. Abb.3). Die extrazelluläre Domäne der TLR enthält 19 bis 25 fortlaufende leucine-rich-repeat-Motive (LRR), welche an der Bindung von Liganden beteiligt sind. Die intrazelluläre Domäne besteht aus der Toll-interleukin-1-Rezeptor-Domäne (TIR), die das Signal fortleitet (Fukata et al. 2009). Bislang sind zehn verschiedene Arten von TLR im menschlichen Organismus beschrieben worden (Park und Lee 2013).

Zhang et al. beobachteten in RT-PCR, Western Blot sowie immunhistochemischen Untersuchungen an Gewebepräparaten lobektomierter Patienten eine übermäßige Expression von TLR4 und TLR9 in tumorösem Lungengewebe. Weiterhin zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Expression von TLR4 und der Malignität des Tumors (Zhang et al. 2009).

Die auf dem intestinalen Epithel als entscheidende anatomische und immunologische Barriere zwischen dem Körper und der großen Vielfalt intraluminaler Mikroorganismen exprimierten TLR führen bei Aktivierung zu einer Produktion anti- oder proinflammatorischer Zytokine (Fukata et al. 2009). Ebenso werden TLR auf den Epithelzellen der Atemwege, Pneumozyten Typ II und Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (Sha et al. 2004; Barton und Kagan 2009). Der Respirationstrakt zeichnet sich durch eine offene Verbindung zur externen Umgebung sowie durch einen engen Raum am Ende der Atemwege aus. Die angeborene Immunität spielt eine entscheidende Rolle in der Abwehr einer Vielzahl von Pathogenen. Alveolar-Makrophagen leiten bei Invasion von Mikroorganismen in die Alveolen eine Immunantwort durch TLR und NLR ein (Fukata et al. 2009). Es zeigte sich in einer Studie von Soong et al. eine Hochregulierung von TLR auf den Epithelzellen der Atemwege bei Infektion (Soong et al. 2004). Veränderte TLR-Expressionen auf Zellen der Lunge ließen sich auch bei COPD-Patienten nachweisen (Droemann et al. 2005; Pons et al. 2006; Sarir et al. 2008). Da TLR auch auf körpereigene Produkte wie Fettsäuren, Phospholipide und Nukleinsäuren reagieren können, werden sie mit der Entstehung von Autoimmunkrankheiten und nichtinfektiösen Entzündungen in Verbindung gebracht (Miyake und Kaisho 2014). Liganden von an der Zelloberfläche exprimierten TLR sind das von gramnegativen Bakterien stammende Endotoxin LPS (TLR4), bakterielle Lipoproteine, Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren (TLR2/1 und TLR2/6) sowie Flagellin (TLR5). Endosomale TLR erkennen hauptsächlich Nukleinsäuren, wie doppelsträngige RNA (TLR3), einzelsträngige RNA (TLR7) sowie doppelsträngige DNA (TLR9) (Kluwe et al. 2009; Colotta et al. 2009). Abgesehen von TLR3 führt die Aktivierung aller TLR zu einem MyD88-abhängigen Signalweg. TLR4 kann ein Signal über zwei unabhängige Signalwege weiterleiten (Kawai und Akira 2010; Mitchell et al. 2007). Diese werden reguliert durch toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein (TIRAP)-MyD88 sowie durch TRAM (TRIF-related adaptor molecule)-TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) (Kagan et al. 2008). Sowohl der MyD88-abhängige- als auch der TRIF-abhängige Signalweg führen zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, AP-1, IRF-3/7 etc.) (Kluwe et al. 2009; Rakoff-Nahoum und Medzhitov 2009). Es wird vermutet, dass TLR2 in Abhängigkeit verschiedener mikrobieller Stimuli Cluster unterschiedlicher Kombination,

formiert in lipid rafts, bildet (Triantafilou et al. 2006). Es wurde z.B. durch Experimente an menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK293) gezeigt, dass CD36 mit dem Komplex TLR2/TLR6 kooperiert, um eine Aktivierung von NF κ B als zelluläre Antwort auf LTA zu initiieren (Stuart et al. 2005).

Als Pattern-Recognition Receptor (PRR) des angeborenen Immunsystems ist ebenso wie das LPS-binding protein (LBP) auch CD14 an der Sensibilisierung von Zellen für die Erkennung von LPS gramnegativer Bakterien über TLR4 beteiligt (Kelley et al. 2013). Strukturell weist CD14 eine gebogene, spulenartige Form auf und besteht ähnlich wie TLR aus LRR (Park und Lee 2013).

CD14 verstärkt die LPS-vermittelte Signaltransduktion, indem es zur erleichterten Bindung von LPS an den Komplex TLR4/MD-2 beiträgt (Latz et al. 2002). Weiterhin zeigten Jiang et al., dass CD14 speziell für die Erkennung von sog. smooth LPS sowie die Weiterleitung des Signals über den TRIF/TRAM-Weg verantwortlich ist (Jiang et al. 2005). Es wird angenommen, dass CD14 im Sinne eines multifunktionalen Adapterproteins an der Signalweiterleitung von Liganden durch weitere membranständige und intrazelluläre TLR beteiligt ist (Finberg und Kurt-Jones 2006; Lee et al. 2006). So beobachteten Baumann et al., dass CD14 mit den MyD88-abhängigen TLR7 und TLR9 interagiert, indem es die Erkennung von ssRNA/Imiquimod sowie DNA begünstigt (Baumann et al. 2010). Weiterhin zeigten Zanoni et al. durch Untersuchungen an bone marrow-derived macrophages (BMDM), unreifen dendritischen Zellen vom Wildtyp sowie CD14-defizienten Mäusen, dass CD14 für die LPS-induzierte Endozytose von TLR4 benötigt wird. Es ermöglicht auf diese Weise die endosomale Signalweiterleitung durch TLR4 und damit die Induktion der IFN-Expression (Zanoni et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TLR einen entscheidenden Angriffspunkt für extrazelluläre Liganden darstellen und daher auch für die Interaktion bakterieller Pathogenitätsfaktoren mit NSCLC-Zellen von Bedeutung sind. Weiterhin sind TLR in der Lage, mit Ko-Molekülen wie CD14, CD36 oder LBP zu kooperieren und Komplexe zu bilden, was zusätzlich eine Modifikation der Signalweiterleitung ermöglicht.

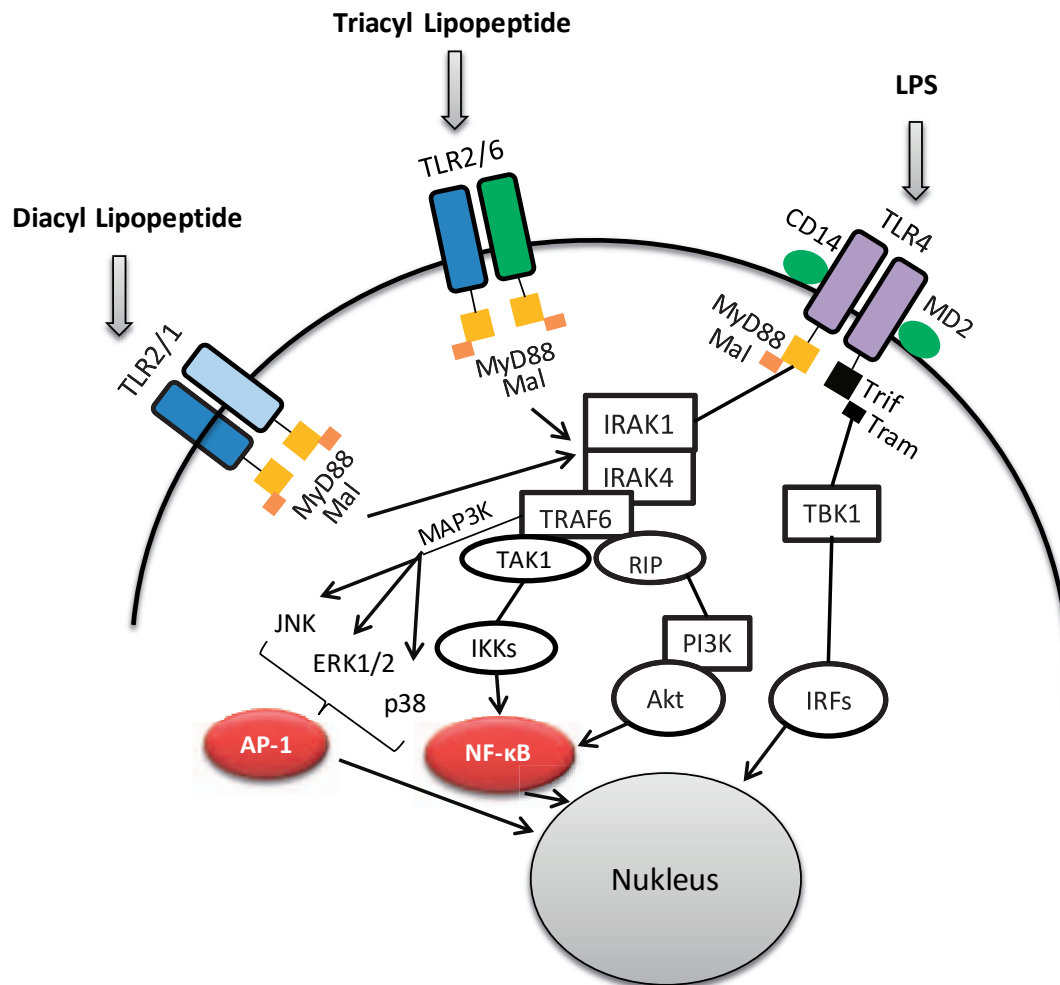


Abb. 3: Liganden der TLR und Signaltransduktion im Überblick.

Modifiziert nach Mitchell et al. (2007).

AKT: protein kinase B (serine/threonine protein kinase) ; AP-1: activator protein 1 ; ERK: extracellular-signal-regulated kinases ; IKK: inhibitor of NF-κB kinase ; IRAK: Interleukin-receptor-associated kinase ; IRFs: Interferon regulatory factors ; JNK: c-Jun N-terminal kinases; MAP3K: Mitogen-activated protein kinase 3 ; MAL: MyD88-adaptor-like ; MyD88: myloid differentiation primary response gene 88 ; NF-κB: nuclear factor kappa-B ; PI3K: phosphatidylinositide 3-kinase ; RIP: receptor interacting protein ; TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β ; TRAM: TRIF-related adaptor molecule ; TRAF6: TNF receptor-associated factor 6; TAK1: TGF-beta activated kinase 1 ; TBK1: TANK-binding kinase 1

1.6 Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8) bzw. CXCL8 ist ein proinflammatorisches CXC Chemokin, dass durch seine Auswirkung auf die neutrophile Chemotaxis und Aktivierung derselben wesentlich an der angeborenen Immunantwort beteiligt ist. Entzündungsmediatoren wie IL-1β und TNF-α, Bakterien (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*), bakterielle Endotoxine wie LPS oder LTA und Viren (z.B. Adenovirus, RSV) führen zur Synthese von IL-8 (Matsushima et al.

1988; Hoffmann et al. 2002; Hattar et al. 2006; Bruder und Kovcsdi 1997; Garofalo et al. 1996; DiMango et al. 1995). Weiterhin können umweltbedingte und chemische Stressoren, z.B. Hypoxie und Chemotherapie, sowie Steroidhormone die Synthese von IL-8 beeinflussen (Brat et al. 2005). Durch Messung von IL-8 lassen sich Rückschlüsse auf die Zellaktivierung schließen (Paul-Clark et al. 2009).

Über die Bindung an zwei heterotrimere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, CXCR-1 (IL-8RA) und CXCR-2 (IL-8RB) vermittelt IL-8 seine biologische Aktivität (Bishayi et al. 2014). CXCR-1 ist spezifisch für IL-8, CXCR-2 bindet auch an andere CXC Chemokine wie z.B. growth-regulated oncogene- α , - β und - γ (GRO- α , - β , - γ) oder das neutrophil-activating peptide-2 (Chuntharapai und Kim 1995; Holmes et al. 1991). Nach Stimulation wird IL-8 von verschiedenen Zellen des Körpers gebildet, u.a. Fibroblasten (Larsen et al. 1989), Endothelzellen (Yoshida et al. 1997), Monozyten (Matsushima et al. 1988) und PMN (Hattar et al. 2006).

Die Promoterregion von IL-8 enthält Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren nuclear factor-kappa B (NF- κ B), activator protein-1 (AP-1) und CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP). NF- κ B scheint jedoch für die Genexpression von IL-8 eine besonders wichtige Rolle zu spielen (Elliott et al. 2001). Das am Ort der Entzündung gebildete IL-8 wird durch Transzytose durch benachbarte Endothelzellen befördert und an ihrer Oberfläche präsentiert (Middleton et al. 1997). Zudem werden durch aktivierte Endothelzellen des Entzündungsgebietes vermehrt Adhäsionsmoleküle für PMN wie E-Selektin und P-Selektin exprimiert sowie PAF gebildet. Durch die Bindung des β_2 -Integrins CD11b/CD18 an ICAM-1 wird die Diapedese von PMN durch Endothel und Epithel zum Ort der Entzündung vermittelt (Faurschou und Borregaard 2003; Chin und Parkos 2007; Naofumi M. 2003). Neben der Rekrutierung von PMN ist IL-8 auch an deren Aktivierung beteiligt. In der Folge kommt es z.B. zur Degranulation der PMN oder einer Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite durch Selbige (Baggiolini et al. 1989; Peveri et al. 1988). In einer Studie von Yoshida et al. zeigte sich, dass IL-8 proangiogenetische Eigenschaften aufweist (Yoshida et al. 1997). Weiterhin scheint sich IL-8 auf die Gefäßdichte von Tumoren auszuwirken und auf diese Weise deren Progression günstig zu beeinflussen. In einer Studie von Arenberg et al. an SCID-Mäusen ließ sich beobachten, dass durch Behandlung des NSCLC mit IL-8-neutralisierenden Antikörpern die Tumorprogression im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert werden konnte (Arenberg et al. 1996). Tumorprogression und kürzere Überlebenszeit in Verbindung mit verstärkter Angiogenese konnten bei Patienten mit NSCLC und hoch gemessenen IL-8-mRNA-Werten nachgewiesen werden (Yuan et al. 2000). Zusammenhänge zwischen Tumorerkrankung und IL-8-Synthese ließen sich auch bei anderen Malignomen, wie dem Magenkarzinom (Li et al. 2014), dem kolorektalen Karzinom (Sun et al. 2014; Itho

et al. 2005) und dem Melanom (Singh et al. 1994) beobachten. In einer von Zhu et al. durchgeführten in-vitro-Studie zeigte sich die Proliferation humaner NSCLC-Zellen unter der Prämisse der zellulären Expression von CXCR-1- und CXCR-2-Rezeptoren durch IL-8 stimulierbar (Zhu et al. 2004). Eine proliferationssteigernde Wirkung des IL-8 auf NSCLC-Zellen konnte auch in Experimenten von Luppi et al. festgestellt werden, der stimulative Effekt ließ sich hierbei auf eine mögliche Transaktivierung zellulärer EGF-Rezeptoren zurückführen (Luppi et al. 2007). Das direkte Wirkungspotential freigesetzten IL-8 stellt demnach sowohl einen parakrinen als auch einen autokrinen Stimulationsfaktor für die Proliferation humaner Tumorzellen dar (Zhu et al. 2004; Luppi et al. 2007).

1.7 Fragestellung

Lungenkrebs, mit einem Anteil von über 80% insbesondere das NSCLC, stellt die weltweit häufigste Krebstodesursache dar. Pulmonale Infektionen schränken die mediane Überlebenszeit onkologischer Patienten zusätzlich ein. Patienten, die an Lungenkrebs leiden, tragen ein besonderes Risiko, an einer Infektion des tracheobronchialen Systems zu erkranken.

Zusammenhänge zwischen Tumorgenese, Tumorprogression und Infektion sind Gegenstand der Forschung und werden in der aktuellen Literatur diskutiert. Toll-like-Rezeptoren, insbesondere TLR2 und TLR4, spielen in der angeborenen Immunität eine wichtige Rolle. Es wurde beschrieben, dass bakterielle Pathogenitätsfaktoren, darunter Endotoxine wie Lipopolysaccharide, die Tumorbilogie des NSCLC beeinflussen. Zellulär produzierte Zytokine modulieren die Immunantwort des Organismus und beeinflussen ihrerseits die Aktivität von Tumorzellen. Bislang lässt sich nicht hinreichend erklären, welche Bedeutung Lipoteichonsäuren grampositiver Keime für die Aktivität, insbesondere Proliferation und Zytokinexpression, von NSCLC-Zellen haben. Darüber hinaus bleibt offen, durch welche zellulären Oberflächenmoleküle der Effekt von Lipoteichonsäuren auf NSCLC-Zellen mediert wird.

Vor diesem Hintergrund ist es das Ziel dieser Arbeit, die im Folgenden aufgeführten Fragestellungen anhand von in vitro durchgeführten Experimenten an der Adenokarzinomzelllinie A549 sowie an der Plattenepithelkarzinomzelllinie H226 zu beantworten:

- a) Welches Verhalten zeigt die Proliferation der getesteten NSCLC-Zelllinien A549 und H226 unter Einwirkung von LTA Typ I unterschiedlicher Konzentration?
- b) Wie verhalten sich Zellstoffwechselaktivität und DNA-Synthese von A549 und H226, wenn sie mit LTA Typ I unterschiedlicher Konzentration inkubiert werden?
- c) Wie verhält sich die IL-8-Synthese von A549 unter Einwirkung von LTA Typ I?
- d) Verändert sich die Proliferation von A549 unter Einwirkung von LTA Typ I, wenn TLR2, TLR4 oder IL-8 durch spezifische monoklonale Antikörper blockiert sind?
- e) Zeigt die IL-8-Synthese von A549 unter Einwirkung von LTA Typ I Veränderungen, wenn TLR2 oder TLR4 durch spezifische monoklonale Antikörper blockiert sind?
- f) Spielt endogen produziertes IL-8 eine Rolle in der Proliferation von A549-Zellen unter Einwirkung von LTA?

2 Material und Methoden

Die Versuche wurden an der Adenokarzinomzelllinie A549 sowie an der Plattenepithelkarzinomzelllinie H226 durchgeführt. Zur Stimulation der Zellen kam die von *Staphylococcus aureus* gebildete LTA Typ I zur Anwendung. Zunächst wurden A549 und H226 mit LTA unterschiedlicher Konzentration über verschieden lange Zeiträume inkubiert. Die Quantifizierung der Zellproliferation erfolgte durch direkte automatisierte Zellzählung (Casy® Cell Count). Des Weiteren wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen durch MTT-Assay und die Aktivität der zellulären DNA-Synthese durch Bromdesoxyuridin (BrdU)-Assay erfasst. In den folgenden Versuchsreihen wurden an A549 die zellulären Oberflächenmoleküle TLR2 und TLR4 durch Einsatz monoklonaler Antikörper selektiv blockiert und die Zellproliferation und Zellstoffwechselaktivität gemessen. Ebenso wurde das zelluläre Signalprotein IL-8 durch Antikörper blockiert und die Zellproliferation von A549 durch Casy® Cell Count gemessen. Weiterhin wurde mittels ELISA untersucht, wie sich LTA auf die IL-8- Synthese von A549-Zellen auswirken. Erneut wurden TLR2 und TLR4 durch Antikörper blockiert und durch ELISA mögliche Veränderungen des LTA-Effektes auf die IL-8-Synthese erfasst.

2.1 Verwendete Geräte

Autoklav	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Casy® Cell Counter + Analyser System Model TT	Innovatis AG Casy® Technology, Reutlingen
ELx808 Absorptions-Reader für Mikroplatten	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Heracell CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Hera Safe KS	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
IKA Vibrax VXR Shaker	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Mikroskop	Olympus, Shinjuku, Tokio/Japan
Öko Santo Kühlschrank	AEG, Frankfurt am Main
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Sterilizer	Memmert, Schwabach
Vacusaft comfort	Integra Biosciences, Fernwald
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen

2.2 Verwendete Materialien

Cryo 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Eppendorf Safe-Lock Tube 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Gewebekulturflaschen T 75	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturplatte, 24 well, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturplatte, 96 well, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauerzählkammer	Kalensee, Gießen
Pasteurpipetten, Glas, 230 mm	VWR International, Radnor/USA
Pipetten, 5 ml – 25/Pk steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipetten, 10 ml – 25/Pk steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipetten, 25 ml, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipetten, 50 ml, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polypropylen-Röhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polypropylen-Röhrchen, 50 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Sterilfilter, 150 ml, 33 mm, 22 µm	Merck Millipore, Billerica/USA

2.3 Verwendete Substanzen

Anti-BrdU-POD working solution	Roche Applied Science, Penzberg
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Biotinylated Anti-human CXCL8/IL-8 Antibody (detection)	R&D Systems, Wiesbaden
BrdU-labeling solution	Roche Applied Science, Penzberg
BrdU-substrate solution	Roche Applied Science, Penzberg
BrdU-washing solution	Roche Applied Science, Penzberg
Casy® clean	Innovatis AG Casy® Technology, Reutlingen
Casy® clean	Innovatis AG Casy® Technology, Reutlingen
Casy® cups	Innovatis AG Casy® Technology, Reutlingen
Casy® ton	Innovatis AG Casy® Technology, Reutlingen
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim

Material und Methoden

CD14 MY-4	Coulter Immunotech, Hamburg
DMEM/F12 Nutmix	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching/Österreich
ELISA Substrate Reagent Pack	R&D Systems, Wiesbaden
Fetal bovine serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching/Österreich
Glutamin 200mM	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
LTA-SA purified (Staph. aureus)	InvivoGen, San Diego/USA
1 Mol H ₂ SO ₄	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Human CXCL8/IL-8 Antibody (Catalog # MAB208)	R&D Systems, Wiesbaden
Human CXCL8/IL-8 Biotinylated Antibody (Catalog # BAF208)	R&D Systems, Wiesbaden
N-2-Hydroxyethylpiperazin N-2- Ethansulfonsäure (Hepes)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaCl, 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
0,05% Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nichtessentielle Aminosäuren 10 mM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin, 1000 U/ml Pen, 10 mg/ml Strep	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Phosphate buffered saline (PBS)	Pan Biotech, Aidenbach
Recombinant Human CXCL8/IL-8	R&D Systems, Wiesbaden
RPMI mit Glutamin	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
5% Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Streptavidin Horse Radish-Peroxidase Enzym (HRP)	R&D Systems, Wiesbaden
TLR2 clone TL2.1	e-Bioscience, San Diego, USA
TLR4 clone HTA 125	e-Bioscience, San Diego, USA
Trypsin/EDTA	Pan Biotech, Aidenbach
0,05 % Tween 20	Sigma-Adrich, Steinheim
20 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (PUFFERAN®)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.4 Verwendete NSCLC-Zelllinien

A549	Cat-No. CCL-185, ATCC, Manassas, USA
H226	Cat-No CRL-5826, ATCC, Manassas, USA

Histologie:

Die für die Experimente verwendeten Zelllinien A549 und H226 sind histologisch dem NSCLC zuzuordnen (Tsai et al. 2014). A549 ist eine Adenokarzinomzelllinie (Huang et al. 2014; Ruan et al. 2014), zeigt als p53-Status einen Wildtyp (Lu et al. 2001; Lehman et al. 1991) und eine c-K-ras-Mutation in Position 12 (Valenzuela und Groffen 1986). H226 lässt sich als Plattenepithelkarzinomzelllinie charakterisieren (Balcer-Kubiczek et al. 2007; Phelps et al. 1996), weist keinen eindeutig definierbaren p53-Status auf (Berglind et al. 2008) sowie ein nicht mutiertes K-ras-Gen (Wildtyp) (Symonds et al. 2011).

Eingesetzte Medien:

<i>Kulturmedium für A549 und H226:</i>	<i>Versuchsmedium für A549 und H226:</i>
87 % DMEM/F12 Nutmix	96 % DMEM/F12 Nutmix
10 % FCS	1 % FCS
1 % Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Pen, 10 mg/ml Strep)	1 % Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Pen, 10 mg/ml Strep)
1 % Glutamin 200mM	1 % Glutamin 200mM
1 % nichtessentielle Aminosäuren	1 % nichtessentielle Aminosäuren
10 mM	10 mM

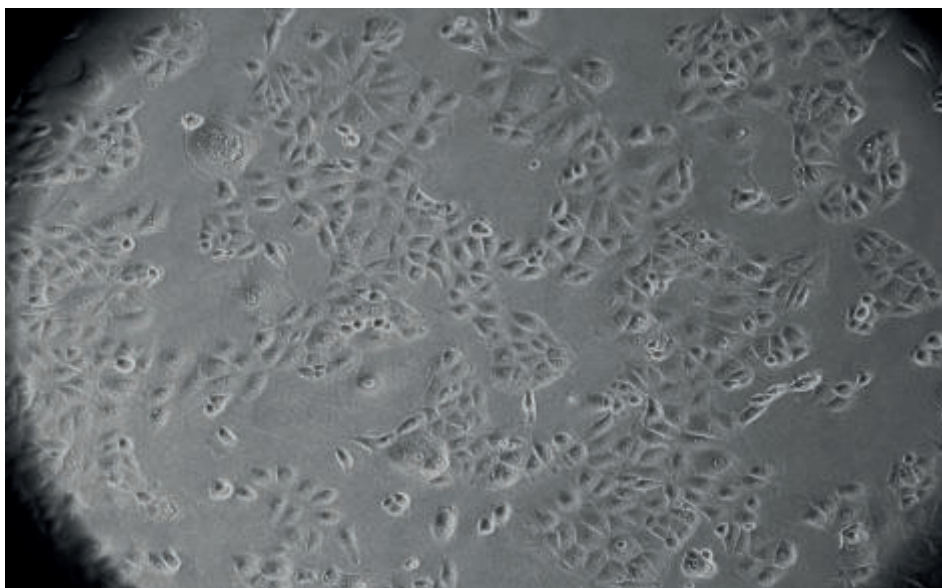


Abb. 4: Lichtmikroskopische Aufnahme von H226 in Kultur, Vergrößerung 10 x.

2.5 Verwendete Software

Casy® blue Evaluation Program	Innovatis AG Casy® Technology, Reutlingen
Casy® excell	Innovatis AG Casy® Technology, Reutlingen
Gen5™ Datenanalyse-Software	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
GraphPad PRISM, Version 5	GraphPad Software, Inc., San Diego/USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond/USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond/USA
Mozilla Firefox 23.0.1	Mozilla Foundation, Mountain View/USA
R package version 1.1-7	R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich
R package version 2.0-20	
Windows Vista	Microsoft Corporation, Redmond/USA
Windows XP	Microsoft Corporation, Redmond/USA

2.6 Methodik

Im Folgenden werden die Arbeitsabläufe sowie deren zugrunde liegende Methodik beschrieben.

2.6.1 Zellkultur

Die NSCLC-Zelllinien H226 und A549 wurden in einem CO₂-Inkubator bei 5% CO₂-Belüftung und 37°C unter sterilen Bedingungen in T 75-Zellkulturflaschen (T 75) kultiviert. Alle drei bis vier Tage erfolgte ein Wechsel der zellentsprechenden Kulturmedien.

2.6.2 Passagierung der Zellen

Die Passagierung der Zellen wurde zeitgleich zum Wechsel des Kulturmediums durchgeführt. Zunächst wurde 1 ml FCS in ein steriles 50 ml Polypropylenröhrchen (PP-Röhrchen) gegeben. Nachdem das alte Kulturmedium aus der T 75-Zellkulturflasche abgesaugt wurde, wurde der Zellrasen mit 8 ml PBS gewaschen und dieses danach abgesaugt. Nun schloss sich eine dreiminütige Inkubation mit 4 ml Trypsin an, um die Zellen vom Boden zu lösen. Anschließend wurden die Zellen durch Resuspendieren voneinander getrennt und 4 ml Zellflüssigkeit ins PP-Röhrchen gefüllt. Nun wurden 8 ml PBS in die T 75-Schale gegeben, erneut resuspendiert und ebenfalls ins PP-Röhrchen gefüllt. 10 µl der Flüssigkeit aus dem PP-Röhrchen wurden in eine Neubauerzählkammer pipettiert. Durch die in der Neubauerzählkammer ermittelte Zellzahl konnte die sich in der T 75-Schale befindliche Zahl der Zellen berechnet werden.

Nachdem das PP-Röhrchen im folgenden Arbeitsschritt bei 1200 rpm (Einstellung: 60 s bis 1200 rpm, Abbremsen in 1 min) für fünf Minuten zentrifugiert wurde, wurde der Überstand abgesaugt und so viel Kulturmedium auf das Zellpellet gegeben, dass in einem Milliliter Medium rechnerisch eine Million Zellen vorhanden sein mussten. Nun konnte aus dem PP-Röhrchen die gewünschte Menge an Zellen in eine neue T 75-Schale pipettiert werden. Es wurde die entsprechende Menge an Kulturmedium vorgelegt, so dass sich insgesamt immer 13 ml Flüssigkeit in einer T 75-Schale befanden.

2.6.3 Proliferationsassays

Die direkte und indirekte Bestimmung der Proliferation humaner und vitaler NSCLC-Zelllinien spielen in dieser Arbeit eine zentrale Rolle. Zum Zeitpunkt der LTA-Stimulation wurde in jeder Versuchsreihe ein Proliferations-Kontrollwert aus unstimulierten Zellen ermittelt. Um Änderungen im Proliferationsverhalten der Zellen zu erfassen wurden die Messergebnisse unter Einwirkung einer zu testenden LTA-Konzentration stets prozentual zur unstimulierten Kontrolle dargestellt.

2.6.3.1 Direkte Bestimmung der Proliferation durch Zellzählung im Casy® Cell Count

Aussaat der Zellen:

Zunächst wurde die Zellzahl wie oben beschrieben auf 1 Million pro Milliliter Medium eingestellt. Die Versuche wurden in 24-well-Gewebekulturplatten durchgeführt. In jedes beimpfte well wurden 500 µl Medium pipettiert. Aufgrund einer unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit der drei Zelllinien wurden 30000 H226-Zellen pro well sowie 15000 A549-Zellen pro well ausgesät. Hierzu wurde die benötigte Menge Zellsuspension sowie das benötigte Volumen Kulturmedium in ein PP-Röhrchen vorgelegt und mittels Multipipette 500 µl pro well ausgesät.

Stimulation der Zellen mit LTA:

Nach einer 24-stündigen Adhärenzzeit wurden die wells mit unterschiedlichen Konzentrationen LTA (0,01 – 1 µg/ml) beimpft oder unstimuliert belassen (Kontrolle). Mindestens zwei wells pro Gewebekulturplatte wurden mit der identischen LTA-Konzentration beimpft. Die verschiedenen LTA-Konzentrationen wurden durch mehrmaliges Verdünnen hergestellt. In vier PP-Röhrchen wurde dazu eine bestimmte Menge Versuchsmedium vorgelegt. In das erste PP-Röhrchen wurden anschließend 50 µl LTA der Konzentration 1 mg/ml aus einem frisch aufgetauten LTA-Aliquot pipettiert. Bei zuvor in das PP-Röhrchen vorgelegten 4950 µl Versuchsmedium erfolgte eine Verdünnung des LTA auf 10 µg/ml. Im Folgenden wurden nach mehrmaligem

Resuspendieren hieraus 500 µl entnommen und das LTA im zweiten PP-Röhrchen mit 4500 µl Versuchsmedium auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt. Nach gleichem Prinzip wurde weiterverdünnt auf 0,1 µg/ml und 0,01 µg/ml LTA.

Bevor der Zellrasen mit 500 µl der LTA-Lösung stimuliert werden konnte, wurden die wells abgesaugt, mit PBS gewaschen und erneut abgesaugt.

Ablauf der Zellzählung:

Bei der oben beschriebenen Zellaussaat wurde die Zellzahl zuvor mittels Neubauerzählkammer berechnet und die gewünschte Menge auf die einzelnen wells verteilt. Die Zellzahl wurde nach einer Adhärenzzeit von 24 Stunden zum Zeitpunkt der Stimulation mit LTA (Zeitpunkt 0), weiteren 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden gemessen. Die Bestimmung der Proliferation vitaler Zellen erfolgte mittels Stromausschlussverfahren.

Stromausschlussverfahren: Das Casy® Cell Counter + Analyser System

Das Stromausschlussverfahren hat eine Messung der Permeabilität der Zellmembran zum Prinzip (Roche Applied Science 2010). Vitale Zellen mit intakter Zellmembran sind elektrische Isolatoren, bei toten Zellen mit defekter Zellmembran hingegen wird der zytoplasmatische Raum leitfähig (Glauner 2006). Mittels einer durch Pulsflächenanalyse aufgezeichneten Größenverteilung kann die tatsächliche Größe vitaler Zellen sowie das Zellmatrixvolumen toter Zellen detektiert werden (Roche Innovatis AG 2002). Dabei werden die in isotoner Elektrolytlösung suspendierten Zellen einzeln durch eine Präzisionsmesspore gesaugt und bei diesem Prozess durch ein mit 1 MHz getaktetes Niederspannungsfeld abgetastet, welches über zwei Platinelektroden an der Kapillarstrecke angelegt wird (Roche Innovatis AG 2002). Die durchtretenden Zellen verdrängen mit ihrem Volumen eine bestimmte Menge der Elektrolytlösung, intakte Zellen führen entsprechend ihrer Eigenschaft als Isolatoren zu einer Widerstandserhöhung über die Kapillarstrecke. Jede Zelle führt zu einer spezifischen Widerstandsänderung, die nach Fläche, Höhe, Breite und Zeitverlauf analysiert wird. Da die Zellmembran toter Zellen keine elektrische Barriere mehr darstellt, werden sie mit der Größe ihres Zellkerns erfasst. Zugeordnet und aufgespeichert werden die Zellsignale in einem aus 524288 Kanälen bestehendem Vielkanalanalysator. Aus den Einzelmessungen wird das Integral des Messsignals berechnet und standardisiert ausgewertet. Die volumenlineare Originalverteilung wird schließlich umgerechnet und in einer durchmesserlinearen Größenverteilung dargestellt (Roche Innovatis AG 2002).

Versuchsauswertung:

Nach Absaugen des Überstandes mussten die adhärennten Zellen zunächst mit Trypsin von den Böden der Wells gelöst werden. Für spätere Messungen von IL-8 wurden bei A549 die Überstände einiger Versuche nicht abgesaugt und verworfen, sondern in Eppendorf-Cups gesammelt und eingefroren. Nach Zugabe von „Stopsolution“ (20 % FCS gelöst in PBS) wurde die Zellsuspension mehrfach resuspendiert. Pro zu messendem Well wurde je ein Casy® cup mit 5 ml Casy® ton (isotone Elektrolytlösung) befüllt. Nun wurden 100 µl Zellsuspension entnommen und in das Casy® cup pipettiert. Es wurde ein Messvolumen von 400 µl pro Messung eingestellt.

Die Auswertung der gemessenen Proben erfolgte durch das Casy® blue Evaluation Program. Die unter MS-Excel™ programmierte Anwendung erlaubt das Einlesen von Messdaten des Cell Counter + Analyser Systeme Model TT von innovatis AG. Die Speicherung der Daten erfolgte mit dem Programm Casy® excell.

Die optimalen Cursorpositionen für die Vitalitätsdifferenzierung wurden nach dem Stromausschlussverfahren errechnet. Als 2-D-Overlay wurden die Mittelwertkurven der eingelesenen Lebend- und Totmessungen mit den ermittelten Cursorsn dargestellt. Zusammen mit ihren Standardabweichungen wurden die zur Ergebnisbeurteilung relevanten Parameter für die Lebend- und Totmessungen angezeigt. Drei Messungen wurden pro Well direkt hintereinander und vollautomatisch durchgeführt. Anschließend wurden die Ergebnisse in einer MS-Excel-Datei zusammengefasst. Die Messwerte der mit LTA stimulierten Proben wurden prozentual zur unstimulierten Kontrolle dargestellt.

2.6.3.2 Indirekte Bestimmung der Proliferation durch MTT-Assay

Kolorimetrische Enzymaktivitätsbestimmung:

Die Aktivität von Enzymen kann durch kolorimetrischen Assay indirekt durch einen Farbumschlag im Spektrophotometer dargestellt werden (Armbrecht 2011). Die kinetische Messung erfolgt nach der Endpunktmethode (Wollenberger et al. 2012), wobei die Substratumsetzung des Enzyms nach einer bestimmten Zeit abgestoppt wird. Das für die enzymatische Reaktion verwendete künstliche Substrat setzt nach der Spaltung durch das Enzym ein Farbmolekül frei, welches anschließend photometrisch gemessen wird (Armbrecht 2011).

Messprinzip:

Durch Anwendung des MTT-Assays lässt sich die metabolische Aktivität von Zellen darstellen (Promega Corporation 2012). Das CellTiter 96® AQueous One Solution Reagenz besteht aus einem Tetrazolium-Präparat sowie aus einem elektronenkoppelnden Mittel, Phenazine Ethosulfat (PES).

Der Farbumschlag des gelben 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTT) in lilafarbenes Formazan ist direkt proportional zu der Anzahl der in Zellkultur lebenden Zellen (Cory et al. 1991). Die Menge des umgesetzten farbigen Produktes, dargestellt durch Absorption bei 490 nm, ist proportional zu der Anzahl der enthaltenen lebenden Zellen (Promega Corporation 2012).

Aussaat der Zellen:

Für die beschriebenen Versuchsreihen wurden 96-well-Gewebekulturplatten verwendet. Die für einen Versuch benötigte Zellzahl sowie das benötigte Volumen wurden folgendermaßen berechnet: In den Versuchsreihen an A549 wurden 1500 Zellen pro well ausgesät, in den Versuchsreihen an H226 5000 Zellen pro well. Das benötigte Volumen Kulturmedium betrug je zu beimpfendem well 200 µl.

Stimulation der Zellen mit LTA:

Die Zellen wurden entweder unstimuliert belassen (Kontrolle) oder mit LTA in den Konzentrationen 0,01, 0,1 und 1 µg/ml stimuliert. Pro LTA-Konzentration wurden jeweils fünf wells beimpft. Die getesteten LTA-Konzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml wurden, wie unter 2.6.3.1 beschrieben, durch mehrfaches Verdünnen hergestellt, nachdem die insgesamt benötigte Menge an Versuchsmedium berechnet wurde.

Versuchsauswertung:

Je Versuch erfolgten die Messungen 6 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden nach Stimulation mit LTA. Zweieinhalb Stunden vor jeder Messung wurden in jedes zu messende well der 96-well-Gewebekulturplatte 20 µl der MTT-Substanz pipettiert und die Platte anschließend lichtgeschützt bei 37°C sowie Belüftung mit 5% CO₂ inkubiert. Nach Inkubation wurde die Absorption des Lichts bei 490 nm im ELx808 Absorptions-Reader spektrophotometrisch gemessen. Die Messwerte der mit LTA stimulierten Proben wurden prozentual zur unstimulierten Kontrolle dargestellt.

ELx808 Absorptions-Reader:

ELx808 von Bio-Tek ist ein Reader-Assay-System mit acht Kanälen und misst die optische Dichte von Lösungen in 96-well-Gewebekulturplatten mit Wellenlängen zwischen 380 nm und 900 nm. Bevor die Messung erfolgt, wird die eingesetzte 96-well-Gewebekulturplatte für mehrere Sekunden mit einer definierten Geschwindigkeit und über einen definierten Zeitraum geschüttelt. Einstellungen der Assay-Optionen, Steuerung und Berechnung der gemessenen Daten erfolgten mittels Gen5™ Datenanalyse-Software (Bio-Tek Instruments 2005).

2.6.3.3 Nicht-radioaktive Messung der DNA-Neusynthese durch BrdU-Assay

Voraussetzung zellulärer Vermehrung ist die Replikation genomischer DNA (Heinrich und Löffler 2014). Die DNA-Synthese kann daher als indirekter Parameter für die Proliferation von Zellen dienen. Der Assay basiert auf dem Einbau des Pyrimidin-Analogons 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen (Roche Applied Science 2013). Die Zellen werden in dem Zeitraum, in dem die Proliferation bestimmt werden soll, zusammen mit der BrdU-labeling solution inkubiert. Nach anschließender Fixierung der Zellen und Denaturierung der DNA erfolgt die Zugabe eines BrdU-spezifischen Antikörpers (Porstmann et al. 1985). Dieser bindet an das in der neu synthetisierten DNA eingebaute BrdU. In der folgenden Substratreaktion können die gebildeten Immunkomplexe nachgewiesen und durch Absorptionsmessung im ELx808 Absorptions-Reader quantifiziert werden (Rode 2008).

Versuchsdurchführung:

Analog zum MTT-Assay wurden 2500 A549-Zellen mit 200 µl Medium pro well in 96-well-Gewebekulturplatten ausgesät. Nach 24 Stunden Adhärenzzeit wurde eine Verdünnungsreihe mit LTA erstellt und anschließend jeweils acht wells pro Gewebekulturplatte mit 200 µl 0,01 µg/ml LTA, 0,1 µg/ml LTA und 1 µg/ml LTA stimuliert. Hinzu kamen weitere acht wells als Kontrollen und vier wells für den blank, in die nur 200 µl Versuchsmedium ohne LTA gegeben wurden. Die Platten wurden 24 Stunden nach Stimulation mit LTA gestoppt, der Überstand ausgeklopft und bis zur Messung bei 4°C gelagert. Die Zellen der Platten wurden zum Zeitpunkt der LTA-Stimulation mit 20 µl/well BrdU labeling solution markiert.

Versuchsauswertung:

Die Messung der Platten erfolgte zum selben Zeitpunkt nach Abschluss des Versuches und gliederte sich in folgende Arbeitsschritte:

Zunächst wurden 200 µl/well FixDenat Lösung auf die Zellen pipettiert und die Platten bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach anschließendem Ausklopfen wurden 100 µl/well Anti-BrdU-POD working solution auf die Zellen gegeben und diese für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Antikörperlösung wieder zu entfernen, wurden die Platten ausgeklopft und die wells mit 250 µl washing solution dreimal hintereinander gewaschen. Nachdem auch die washing solution durch Ausklopfen wieder entfernt wurde, wurden 100 µl/well Substratlösung auf die Zellen gegeben und diese für etwa fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich ein deutlich sichtbarer Farbumschlag vollzog. Pro well wurden in einem letzten Arbeitsschritt 25 µl H₂SO₄

hinzugegeben, um die Reaktion zu beenden. Die Absorption wurde bei 450 nm im ELx808 Absorptions-Reader spektrophotometrisch gemessen. Die Messwerte der mit LTA stimulierten Proben wurden prozentual zur unstimulierten Kontrolle dargestellt.

2.6.4 Proliferationsbestimmung unter Einsatz von Antikörpern gegen TLR2, TLR4, und IL-8

Die folgenden Versuchsreihen wurden mit der Zelllinie A549 durchgeführt. Ziel der Experimente war es, das Proliferationsverhalten der Zellen unter Einfluss von LTA und gleichzeitiger Blockade der zellulären Oberflächenproteine TLR2 und TLR4 zu untersuchen. Das Proliferationsverhalten unter Einwirkung von LTA wurde ebenso unter Blockade des zellulären Signalmoleküls IL-8 untersucht.

Ermittlung und Herstellung der geeigneten Antikörperdosierungen:

In Vorversuchen wurden die Konzentrationen der TLR-Antikörper ermittelt, bei welcher sich ohne Zugabe von LTA kein Effekt auf das Wachstum der Zellen zeigte. Dies diente dem Zweck, Auswirkungen der Antikörper auf den LTA-Effekt isoliert interpretieren zu können.

Die TLR-Antikörper wurden in aufsteigender Konzentration (0,1 bis 5 µg/ml) den wells zum Zeitpunkt der Stimulation mit LTA hinzugefügt. Um eine etwaige intrinsische Aktivität der Antikörper auszuschließen, wurden diese den Zellen auch in Abwesenheit von LTA zupipettiert. Nach Auswertung der Ergebnisse wurden die weiteren Versuche mit TLR2/4-Antikörpern in der Konzentration 0,5 µg/ml durchgeführt. Die IL-8-Antikörper wurden in der bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Konzentration 5 µg/ml eingesetzt.

Versuchsdurchführung:

Die folgenden Versuche dienten der Ermittlung des Effekts von TLR2-, TLR4- und IL-8-Antikörpern auf die Zellproliferation (Casy® Cell Count) sowie auf die IL-8-Freisetzung (IL-8-ELISA) unter LTA-Einfluss und erfolgten an A549-Zellen.

Casy® Cell Count:

Je Versuch wurden fünf 24-well-Gewebekulturplatten verwendet: Eine Kontrollplatte, zwei Platten für die Messung 24 Stunden nach Stimulation mit LTA und zwei Platten für die Messung 48 Stunden nach Stimulation mit LTA. Es wurden 15000 Zellen pro well ausgesät.

Die Stimulation der Zellen mit LTA sowie die Zugabe der Antikörper erfolgten zeitgleich mit der Messung der Referenzplatte 24 Stunden nach Zellaussaat. Die Zellen wurden mit LTA in den Konzentrationen 0,1 µg/ml und 1 µg/ml stimuliert. Die Antikörper gegen TLR2, TLR4 und IL-8 wurden in den geeigneten, oben beschriebenen Konzentrationen

eingesetzt. Jedes well wurde mit 500 µl Zellsuspension beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂-Beflutung.

Um die Zellen aller wells einheitlich mit 560 µl Flüssigkeit zu bedecken und somit gleiche Wachstumsbedingungen zu schaffen, wurden in die restlichen wells ohne Antikörper je 60 µl Versuchsmedium bzw. 0,1 µg/ml LTA oder 1 µg/ml LTA enthaltendes Versuchsmedium pipettiert. Die Messung erfolgte durch automatisierte Zellzählung im Casy® Cell Counter. Die 560 µl Überstand der zu messenden wells wurden bei diesen Versuchsreihen allerdings nicht abgesaugt und verworfen, sondern in Eppendorf-Cups zur weiteren Verwendung für die IL-8 Bestimmung (siehe 2.6.5) gesammelt. Nach fünf Minuten Zentrifugation bei 15000 rpm wurde der Inhalt jedes Cups in weitere Eppendorf-Cups aufgeteilt, diese beschriftet und anschließend bei -20 °C eingefroren. Auf diese Weise konnten die Überstände jedem Versuch zugeordnet und zu einem späteren Zeitpunkt die IL-8-Synthese quantifiziert werden.

2.6.5 IL-8-ELISA

Der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gehört zu den enzymatischen Immunadsorptionsverfahren (EIA) und ist ein biochemischer Assay, um in einer flüssigen Probe ein bestimmtes Antigen (z.B. Peptide, Proteine, Hormone) oder einen bestimmten Antikörper zu detektieren und zu quantifizieren (Gan und Patel 2013). Zugrunde liegt das immunologische Konzept, dass ein Antigen an einen spezifischen Antikörper bindet. Es werden unterschiedliche ELISA-Verfahren angewandt, die folgenden Ausführungen konzentrieren sich jedoch nur auf das für die durchgeführten Versuche relevante Prinzip des sog. Sandwich-ELISAs.

Beim Sandwich-ELISA werden zwei für das Antigen spezifische Antikörper eingesetzt, die aber an unterschiedliche Epitope des Antigens binden (s. Abb.5). Zunächst erfolgt die Inkubation der Probe, meistens in 96-well-Gewebekulturplatten, zusammen mit dem Capture-Antikörper. In dieser Zeit bindet der Antikörper an das in der Probe enthaltene nachzuweisende Antigen. Das anschließende Waschen der wells entfernt die ungebundenen Bestandteile der Probe, es verbleibt nur das am Capture-Antikörper gebundene Antigen. Anschließend erfolgt die Zugabe des Detection-Antikörpers, welcher das Antigen an einem anderen Epitop bindet. Der Detection-Antikörper wurde zur Nachweisbarkeit zuvor an einen Enzym-gekoppelten Antikörper gebunden. Nachdem auch der Detection-Antikörper an das in der Probe enthaltene Antigen gebunden hat, werden durch Waschen der wells die überschüssigen Detection-Antikörper entfernt. Nun kann durch Zugabe eines zum Enzym passenden chromogenen Substrates, welches vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt wird, das Antigen in der Probe detektiert und quantifiziert werden. Das Reaktionsprodukt wird

durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemilumineszenz nachgewiesen. Da bereits geringe Enzymmengen das Reagenz über einen längeren Zeitraum vollständig spalten würden und dann alle Proben die gleiche optische Dichte hätten, wird die Reaktion nach einer definierten Zeit gestoppt. Hierzu wird das Enzym z.B. durch die Zugabe von H_2SO_4 zerstört und die Farbreaktion beendet. Die Quantifizierung des Reaktionsproduktes erfolgt durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte. Zur Auswertung wird eine Kalibrierungskurve benötigt, die durch eine Serie bekannter Antigenkonzentrationen, der sog. Standardreihe, ermittelt wird (Gan und Patel 2013; Grange et al. 2014).

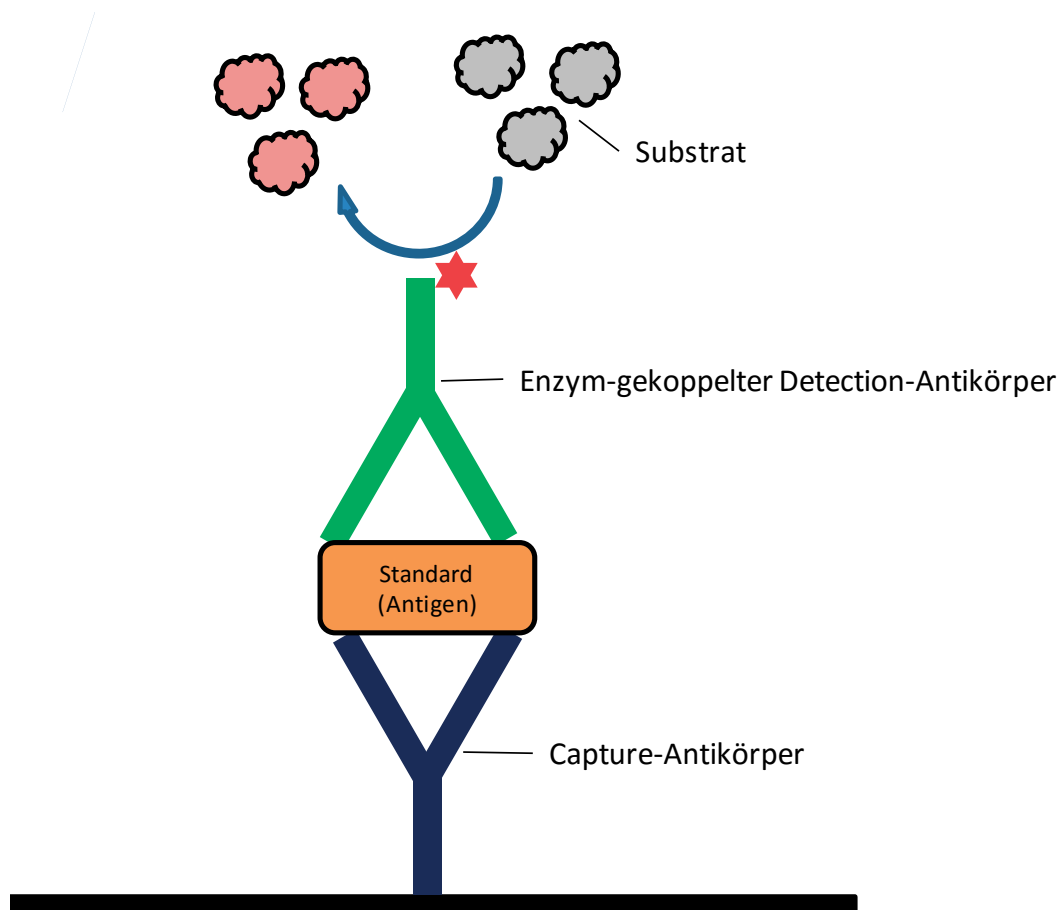


Abb. 5: Prinzip eines Sandwich-ELISAs. Modifiziert nach Horlock et al.

Reagenzien:

1. Antikörper (capture): Monoclonal Anti-human CXCL8/IL-8 Antibody
Aliquots: 500 µg in 1250 µl PBS^{-/-} gelöst und in 100 µl-Mengen aliquotiert
2. Antikörper (detection): Biotinylated Anti-human CXCL8/IL-8 Antibody
Aliquots: 50 µg in 1,25 ml Puffer (20 mM Trizma base, 150 mM NaCl + 0,1% BSA, pH 7,3) gelöst und in 10 µl-Mengen aliquotiert
3. Waschpuffer: 0,05% Tween 20 in PBS^{-/-}, pH 7,4
4. Blockpuffer: PBS^{-/-} + 1% BSA, 5% Saccharose, 0,05% NaN₃
5. Diluent: 1% BSA in PBS^{-/-}
6. Streptavidin HRP: Verdünnung 1 : 200
7. Standard: Recombinant Human CXCL8/IL-8
Aliquots: 10 µg in 1 ml PBS^{-/-} (mit 0,1% HSA) aufgenommen und je 10 µl aliquotiert, Konzentration: 100 ng/10µl
8. Substrate Solution: 5ml Solution A + 5 ml Solution B kurz vor Gebrauch gemischt und lichtundurchlässig gelagert
9. Stop Solution: 1M H₂SO₄

Versuchsdurchführung:

Die Experimente zur IL-8-Synthese wurden an A549 Zellen durchgeführt. Aussaat, Kultur sowie Stimulation der Zellen mit LTA erfolgten bereits im zuvor durchgeführten Casy® Cell Count. Zunächst wurden die gesammelten Überstände der Versuche mit und ohne Einwirkung von LTA untersucht. Anschließend wurden die Überstände der Versuche unter Einwirkung von LTA und Antikörpern untersucht. Zunächst wurden die Platten mit dem Capture-Antikörper beschichtet. Hierfür wurden 100 µl des Capture-Antikörpers mit 10 ml PBS^{-/-} verdünnt (Endkonzentration 4 µg/ml), von dieser Lösung je 100 µg je 100 µl in jedes well gegeben und die Platte lichtgeschützt bei 4°C für 24 Stunden inkubiert.

Die Durchführung des ELISAs gliederte sich in folgende Arbeitsschritte:

1. Zunächst wurden die Platten zweimal mit je 200 µl pro well Waschpuffer gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blocken, wurden anschließend 200 µl pro well Diluent mit 5% humanem Serum-Albumin hinzugegeben und die Platten eine Stunde bei Raumtemperatur und leichtem Rütteln inkubiert.
2. Währenddessen wurde mit Diluent die Standardreihe hergestellt und auf Eis gekühlt. Durch mehrmaliges Verdünnen wurde die Standardsubstanz IL-8 von 100 ng/ml auf 15 pg/ml verdünnt. Der Nullstand enthielt ausschließlich Diluent, ohne Standardsubstanz.

Nun wurden 100 µl Standardverdünnung pro well sowie 100 µl der Proben pro well aufgetragen, anschließend wurden die Platten erneut zwei Stunden bei Raumtemperatur und leichtem Rütteln inkubiert.

3. Nachdem der Detection-Antikörper auf eine Endkonzentration von 40ng/ml verdünnt wurde, wurden die Platten zweimal gewaschen und anschließend 100 µl der Verdünnung pro well pipettiert. Es folgte eine weitere Inkubationsphase für eine Stunde bei Raumtemperatur und leichtem Rütteln.

4. Nach zweimaligem Waschen kamen weitere 100 µl des mit Diluent verdünnten Streptavidin HRP (1:200) pro well hinzu. Es schloss sich eine 20-minütige Inkubationsphase abgedunkelt bei Raumtemperatur und leichtem Rütteln an.

5. Erneut wurden die wells zweimal gewaschen. Von dem Substrate Reagent Pack wurden 15 Minuten vor Benutzung 5,2 ml Reagent A mit 5,2 ml Reagent B gemischt und 100 µl dieses Substratgemisches pro well pipettiert. Für 25 Minuten wurden die Platten abgedunkelt bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert.

6. Die Farbreaktion wurde schlussendlich mit 50 µl 1 M H₂SO₄ pro well gestoppt und die Platten bei 450 nm im ELx808 Absorptions-Reader spektrophotometrisch gemessen.

Im ELISA wurde das freigesetzte IL-8 in pg/ml quantifiziert. Für die Versuchsauswertung wurde die zum jeweiligen Messzeitpunkt quantifizierte IL-8-Freisetzung aus den unbehandelten Kontrollen von der durch LTA-Stimulation induzierten IL-8-Freisetzung subtrahiert, somit kommt Δ IL-8 zur Darstellung.

2.6.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuchsdaten erfolgte mit der Software R (R Development Core Team 2014). Hierzu wurden die Programmeinheiten „lme4“ (Bates et al. 2014) sowie „lmerTest“ (Kuznetsova et al. 2014) eingesetzt. Um interexperimentelle Unterschiede nachweisen zu können, wurden die Daten mittels gemischter linearer Modelle analysiert. Die Variable „Zeit“ wurde zusammen mit „LTA-Konzentration“ als Faktor in einem zweifaktoriellen Modell verwendet. Die Diagramme wurden mit der Software GraphPad PRISM erstellt und die Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) abgebildet. Die gestrichelte, schwarze Linie zeigt die Werte der unstimulierten Kontrollen an, die jeweils mit 100 % gleichgesetzt wurden. Ergebnisse, die nach Analyse das Kriterium der statistischen Signifikanz, $p < 0,05$, erfüllten, wurden mit einem Sternchensymbol markiert.

3 Ergebnisse

In einem ersten Schritt wurde untersucht, welchen Effekt die Inkubation der Adenokarzinomzelllinie A549 und der Plattenepithelkarzinomzelllinie H226 mit LTA in verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation der Tumorzellen hat. Es wurden die LTA-Konzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml getestet. Um Aussagen zum zeitlichen Verlauf der Proliferation treffen zu können, erfolgten die Messungen je nach Versuch 6 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden nach LTA-Stimulation. Die Proliferation der Zellen wurde durch direkte und indirekte Nachweismethoden bestimmt. Mittels automatisierter Zellzählung (Gerät: Casy® Cell Count) konnte die Anzahl vitaler Zellen in einer Probe direkt erfasst werden. Durch zwei weitere Assays, MTT und BrdU, gelang es, die Stoffwechselaktivität sowie die Aktivität der DNA-Synthese darzustellen. Da sich Veränderungen dieser beiden Parameter proportional zum Wachstum einer Zellkultur verhalten, können sie zum indirekten Nachweis der Proliferation herangezogen werden.

Die weiteren Experimente wurden exemplarisch an der Zelllinie A549 durchgeführt. Zunächst wurde der Effekt von LTA verschiedener Konzentrationen auf die IL-8-Synthese von A549 im zeitlichen Verlauf gemessen. Ziel der weiteren Versuche war es, die Bedeutung der zellulären Oberflächenproteine TLR2 und TLR4 für die Zellproliferation unter Einwirkung von LTA zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden TLR2 und TLR4 selektiv durch Antikörper blockiert und die Proliferation im Casy® Cell Counter gemessen. In Vorversuchen wurden zunächst die geeigneten Konzentrationen der TLR-Antikörper bestimmt, unter deren Einsatz sich die Zellproliferation nicht beeinflussen ließ. Es wurde auch eine Blockade des zellulären Signalproteins IL-8 durch neutralisierende Antikörper vorgenommen und deren mögliche Auswirkung auf die Proliferation unter LTA-Einwirkung untersucht. In einem letzten Schritt wurde der Frage nachgegangen, wie sich die Blockade von TLR2 oder TLR4 auf die IL-8-Synthese unter Einfluss von LTA auswirkt.

Aufgrund von interexperimentellen Unterschieden zwischen den Absolutzahlen der gemessenen Zellzahlen, z.B. durch leichte Quantitätsdifferenzen der ausgesäten Zellen, mögliche Differenzen der Wachstumsgeschwindigkeiten verschiedener Zellpopulationen oder durch mögliche Volumendifferenzen der gemessenen Proben, wurden die Messwerte in Bezug auf unstimulierte A549- bzw. H226-Zellen, deren Wachstum als 100% definiert wurde, dargestellt. Das Proliferationsverhalten LTA-stimulierter Zellen sowie der Kontrolle lässt sich auf diese Weise interexperimentell miteinander vergleichen und übersichtlich abbilden.

3.1 Proliferation der NSCLC-Zellen unter Inkubation mit LTA

A549 und H226 wurden mit LTA in den Konzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml inkubiert und die Proliferation nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden durch automatisierte Zellzählung im Casy® Cell Counter gemessen. Abb.6a und Abb.6b zeigen jeweils den zeitlichen Verlauf der Zellproliferation unter Einfluss der verschiedenen LTA-Konzentrationen prozentual in Bezug auf die Kontrolle. Das Verhalten der Zelllinien lässt sich folgendermaßen beschreiben:

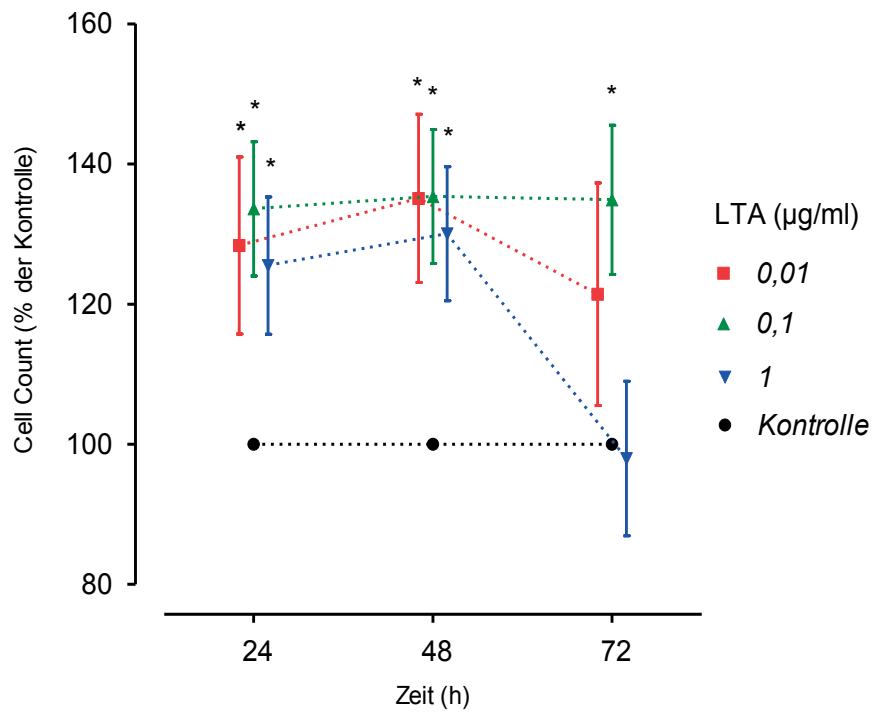
A549 (Abb.6a) zeigten unter Einwirkung von LTA in den Konzentrationen 0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml eine deutliche Zunahme der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle ohne LTA. Am stärksten und konstantesten ließ sich die Proliferationssteigerung unter 0,1 µg/ml LTA beobachten, sie betrug 34% nach 24 Stunden Inkubation, 35% nach 48 Stunden und 35% nach 72 Stunden. Diese Steigerungen unterschieden sich zu allen Messzeitpunkten signifikant von der Kontrolle. Die Inkubation mit 0,01 µg/ml LTA führte nach 24 Stunden zu einem Anstieg um 28%, nach 48 Stunden erreichte der Anstieg mit 35% sein Maximum und fiel im Verlauf nach 72 Stunden auf 21% ab. Ebenso führte die Inkubation mit 1 µg/ml LTA zu einem Anstieg der Proliferation, welcher allerdings mit 26% nach 24 Stunden bzw. 30% nach 48 Stunden etwas geringer ausfiel. Nach 72 Stunden Inkubation fiel die Proliferation unter Einfluss von 1 µg/ml LTA auf 98%, also das Niveau der Kontrolle, ab.

Auch H226 (Abb.6b) zeigten einen Proliferationsanstieg unter Einfluss von LTA. Die gemessenen Counts stiegen nach 48 Stunden Inkubation mit LTA aller Testkonzentrationen im Verhältnis zur Kontrolle am deutlichsten an. Der Proliferationsanstieg nach 48 Stunden betrug unter Einwirkung von 0,01 µg/ml LTA 38%. LTA in der Konzentration 0,1 µg/ml führten zum selben Messzeitpunkt zu einem Anstieg um 34%. Vergleichbar mit A549 ergab die Testkonzentration 1 µg/ml LTA einen etwas schwächer ausgeprägten Proliferationsanstieg, der nach 48 Stunden einen Maximalwert von 28% erreichte.

Zusammenfassend ließ sich beobachten, dass LTA das Wachstum von A549-Zellen und H226-Zellen stimulierten. Am deutlichsten zeigte sich der Proliferationsanstieg beider Zelllinien unter Inkubation mit LTA in den Konzentrationen 0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml zu dem Messzeitpunkt 48 Stunden.

Ergebnisse

a)



b)

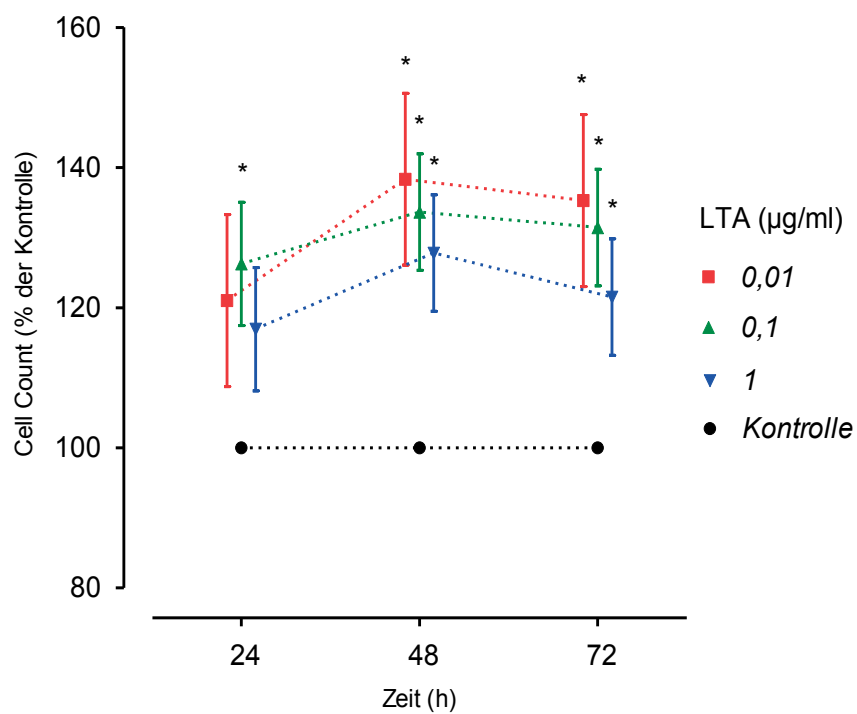


Abb. 6: Proliferation unter Inkubation mit LTA. Messung durch Casy® Cell Count.

a) A549; dargestellt sind Mittelwerte; Streuung der Werte dargestellt als SEM.

$n \geq 4$; * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

b) H226; dargestellt sind Mittelwerte; Streuung der Werte dargestellt als SEM.

$n \geq 4$; * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.2 Zellstoffwechselaktivität unter Inkubation mit LTA

Die Experimente zur Bestimmung der Zellstoffwechselaktivität wurden an den Zelllinien A549 und H226 über einen Versuchszeitraum von 48 Stunden durchgeführt. Die Messungen erfolgten nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden, 24 Stunden sowie 48 Stunden. LTA wurden eingesetzt in den Konzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml. Die Reduktion von MTT wurde in Bezug auf unstimulierte A549- bzw. H226-Zellen abgebildet, deren Wachstum als 100% festgelegt wurde. Insgesamt ließen sich deutliche Anstiege der Zellstoffwechselaktivität unter Einwirkung von LTA aller drei Testkonzentrationen messen.

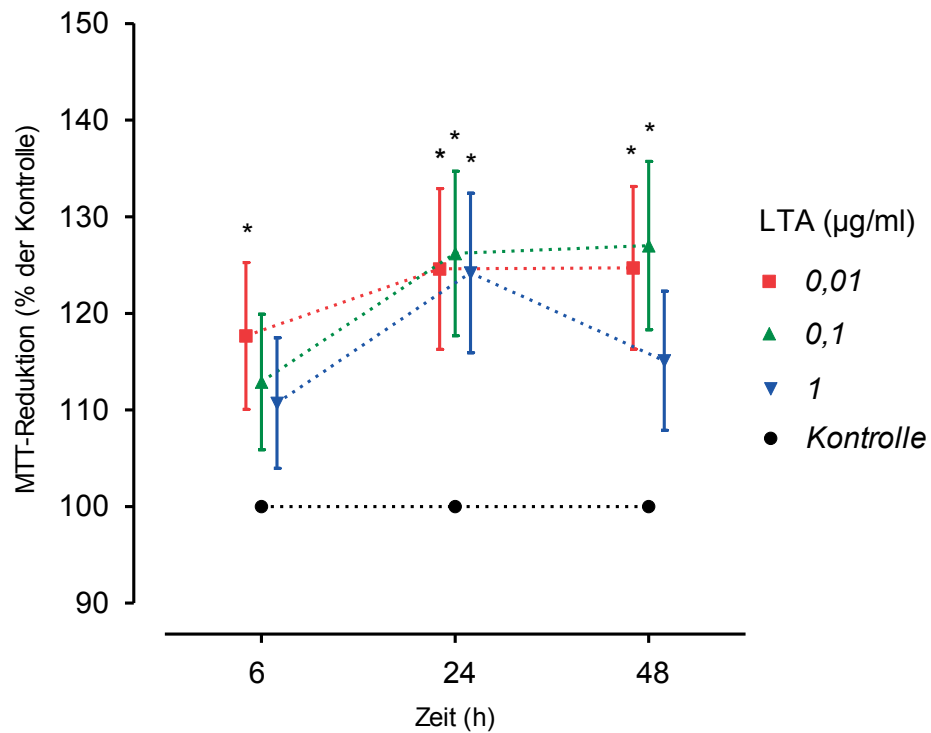
Die Inkubation von A549 (Abb.7a) zeigte nach sechs Stunden eine Zunahme der Stoffwechselaktivität um 18% unter Einwirkung von 0,01 µg/ml LTA bzw. um 13% (0,1 µg/ml LTA) und um 11% (1 µg/ml LTA). Nach 24 Stunden Inkubation erreichte der Anstieg Werte von 25% (0,01 µg/ml LTA), 26% (0,1 µg/ml LTA) und 24% (1 µg/ml LTA). Während der Anstieg nach 48 Stunden unter 1 µg/ml LTA auf 15% abfiel, veränderte er sich unter 0,01 µg/ml LTA sowie 0,1 µg/ml LTA nicht wesentlich im Vergleich zu den 24-Stunden-Werten.

In den Experimenten an H226 (Abb.7b) ließ sich nach sechs Stunden Inkubation mit 0,01 µg/ml LTA ein Anstieg der Stoffwechselaktivität um 19% messen, welcher nach 24 Stunden einen Wert von 32% und nach 48 Stunden einen Wert von 29% erreichte. Gleichermäßen verhielten sich die Zellen unter Testung der zwei weiteren LTA-Konzentrationen. 0,1 µg/ml LTA führten nach 6 Stunden zu einem Anstieg um 15% (bzw. um 10% unter 1 µg/ml LTA), welcher nach 24 Stunden auf 38% (bzw. auf 32% unter 1 µg/ml LTA) anwuchs und nach 48 Stunden einen Wert von 28% (bzw. 19% unter 1 µg/ml LTA) erreichte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass LTA die Zellstoffwechselaktivität von A549 und H226 über alle Zeiträume stimulierten. Am stärksten zeigte sich der Anstieg der Stoffwechselaktivität unter 0,1 µg/ml LTA nach einer Inkubationszeit von 24-48h.

Ergebnisse

a)



b)

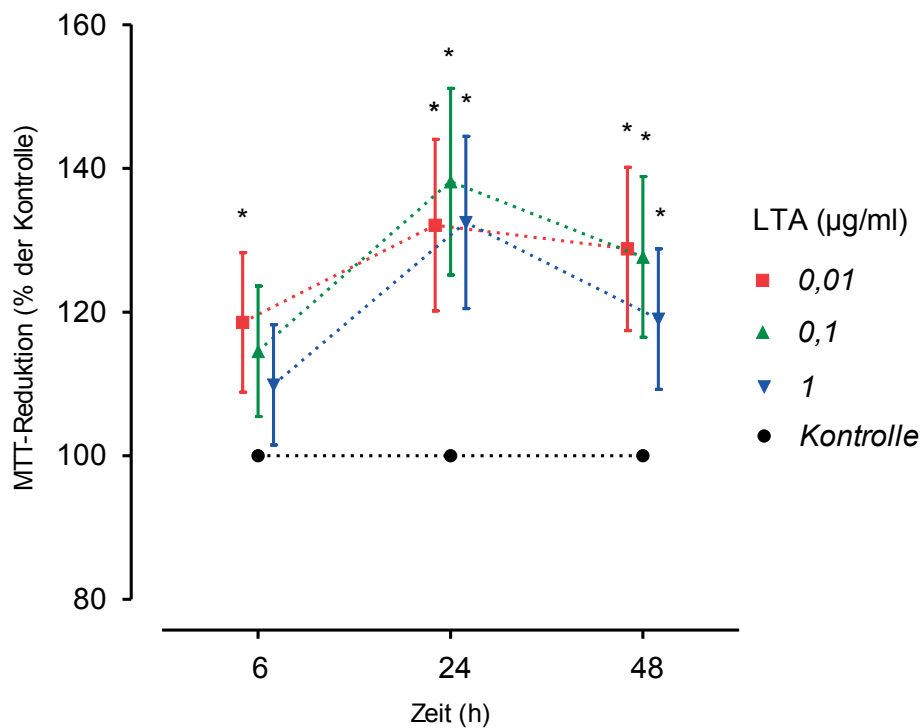


Abb. 7: Zellstoffwechselaktivität unter Inkubation mit LTA. Messung durch MTT-Assay.

a) A549; dargestellt sind Mittelwerte; Streuung der Werte dargestellt als SEM.

$n \geq 7$; * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

b) H226; dargestellt sind Mittelwerte; Streuung der Werte dargestellt als SEM.

$n \geq 7$; * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.3 Aktivität der DNA-Synthese unter Inkubation mit LTA

Als weiterer Proliferationsassay wurden Experimente zur Quantifizierung der Neusynthese von DNA unter LTA-Einfluss an A549 durchgeführt (Abb.8). Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit LTA in den Konzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml inkubiert. Die Messergebnisse, hier die DNA-Inkorporation von BrdU als Parameter der DNA-Synthese, wurden prozentual in Bezug auf die Kontrolle dargestellt. Es zeigte sich ein Anstieg der BrdU-Inkorporation um 29% unter Inkubation mit 0,01 µg/ml LTA, während LTA in den Konzentrationen 0,1 µg/ml und 1 µg/ml zu einem Anstieg um 20% führten.

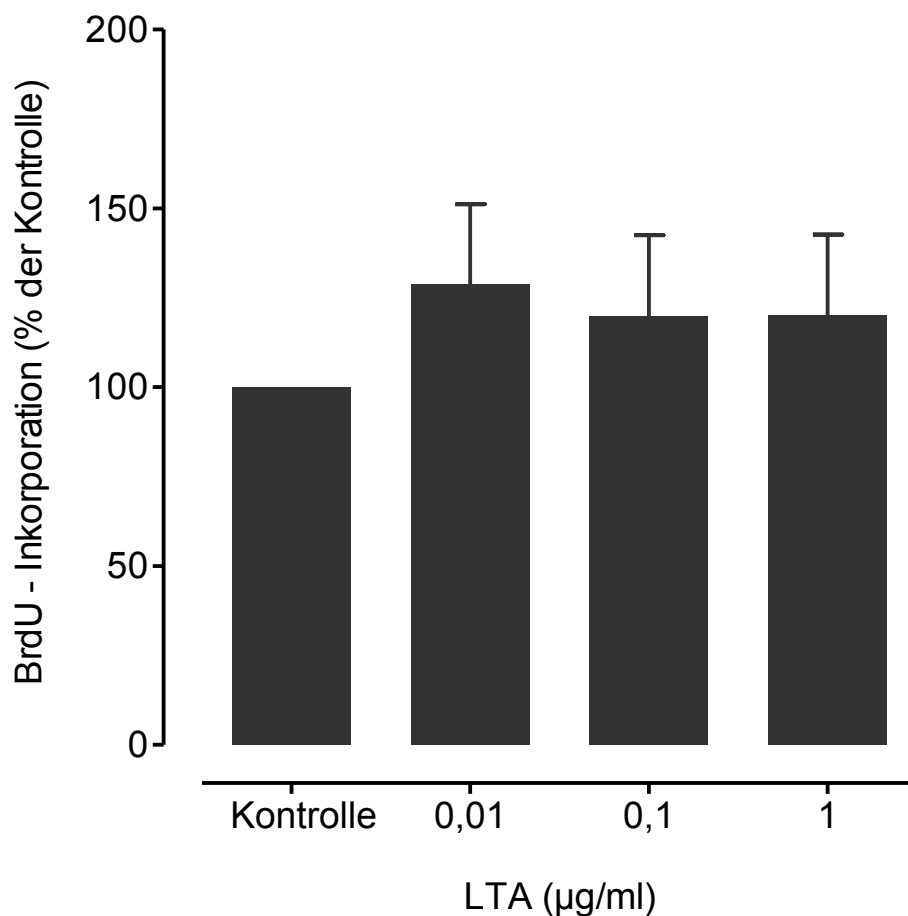


Abb. 8: Aktivität der DNA-Synthese von A549 unter Inkubation mit LTA. Messung durch BrdU-Assay. Dargestellt sind Mittelwerte; Streuung der Werte dargestellt als SEM; $n \geq 5$.

3.4 Einfluss von LTA auf die zelluläre Synthese von Interleukin-8

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich LTA auf die IL-8-Synthese von A549 auswirken (Abb.9). LTA wurden eingesetzt in den Konzentrationen 0,01 $\mu\text{g/ml}$, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ sowie 1 $\mu\text{g/ml}$. Die Messung der IL-8-Synthese wurde 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden nach LTA-Stimulation mittels ELISA durchgeführt. Die Darstellung der IL-8-Synthese erfolgte in der Einheit pg/ml als $\Delta\text{IL-8}$, um den LTA-abhängigen Effekt auf die Synthese von IL-8 im Vergleich zu unstimulierten A549-Zellen abzubilden.

Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Synthese von IL-8 unter Einfluss von 1 $\mu\text{g/ml}$ LTA, die im Zeitverlauf kontinuierlich anstieg. Nach 24-stündiger Inkubation betrug diese 118 pg/ml, nach 48 Stunden 130 pg/ml und nach 72 Stunden 215 pg/ml. Auch die Inkubation mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LTA ergab nach 24 Stunden einen Anstieg der IL-8-Synthese um 22 pg/ml, welcher nach 48 Stunden signifikant auf 64 pg/ml und nach 72 Stunden ebenfalls signifikant auf 114 pg/ml anwuchs. Die Inkubation mit 0,01 $\mu\text{g/ml}$ LTA bewirkte nach 24 Stunden keine Veränderung der IL-8-Synthese im Vergleich zur Kontrolle. Nach 48 Stunden und 72 Stunden zeigte sich hingegen ein Anstieg der IL-8-Synthese um 30 pg/ml bzw. 52 pg/ml.

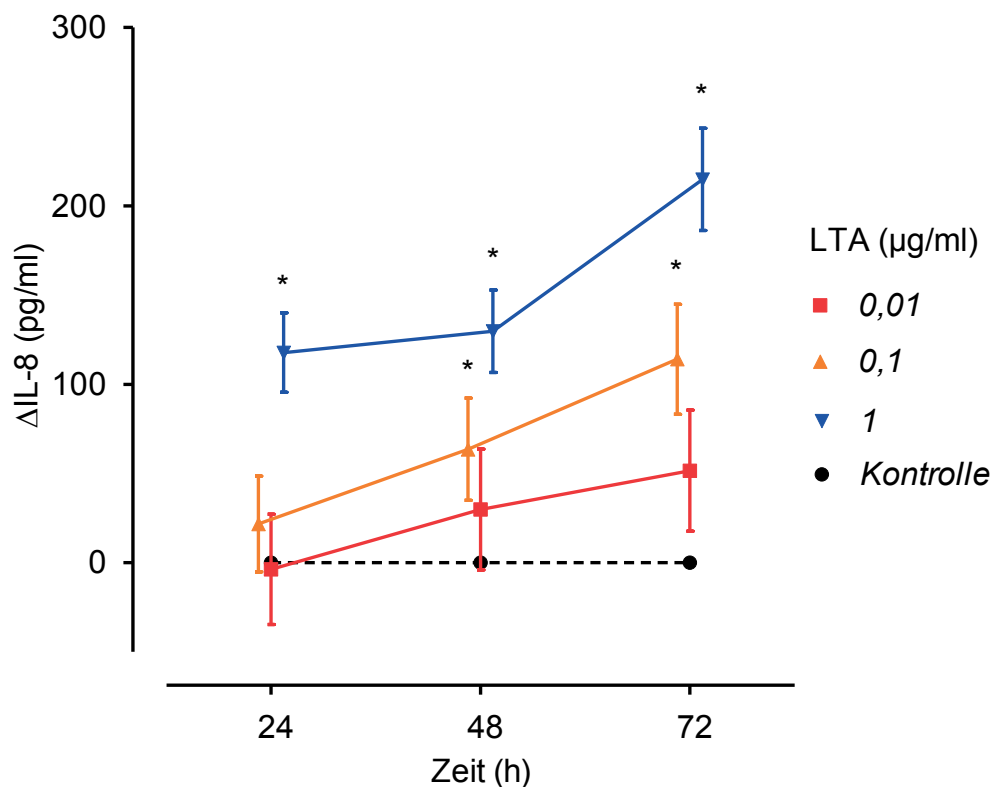


Abb. 9: IL-8-Synthese unter Inkubation mit LTA. Messung durch ELISA. A549; dargestellt sind Mittelwerte; Streuung der Werte dargestellt als SEM. $n \geq 4$; *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.5 Blockade von TLR2, TLR4 und Interleukin-8 durch neutralisierende Antikörper – Effekt auf die Zellproliferation

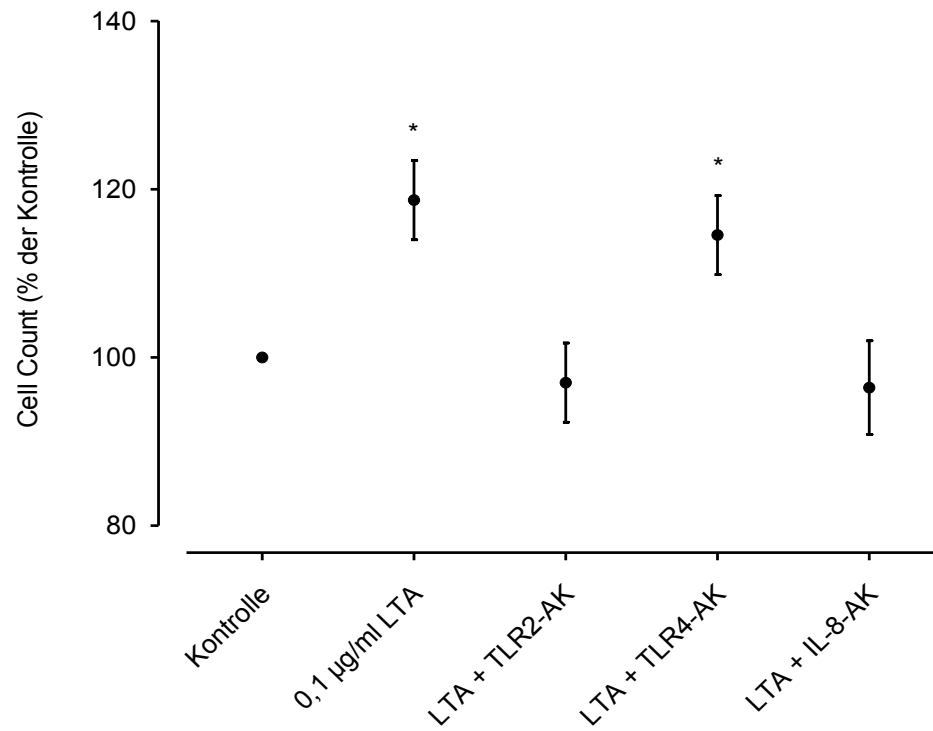
Die folgenden Experimente wurden an der Zelllinie A549 durchgeführt. Ziel der Experimente war es, die Proliferation unter Einwirkung von LTA und gleichzeitiger Inhibition jeweils eines der zellulären Oberflächenmoleküle, TLR2 und TLR4, zu untersuchen. Außerdem wurde untersucht, wie sich die Proliferation unter Einwirkung von LTA und gleichzeitiger Inhibition des zellulären Signalmoleküls IL-8 verhält. Die Messung der Proliferation erfolgte mittels automatisierter Zellzählung. Zur selektiven Blockade von TLR2, TLR4 sowie IL-8 wurden spezifische, monoklonale Antikörper eingesetzt. Eingesetzt wurden LTA in den Konzentrationen 0,1 µg/ml und 1 µg/ml, die TLR-Antikörper in der Konzentration 0,5 µg/ml und die IL-8-Antikörper in der Konzentration 5 µg/ml. Die Proliferation wurde für die eingesetzten LTA-Konzentrationen jeweils nach 24 Stunden und 48 Stunden bestimmt. Die Messergebnisse wurden prozentual in Bezug auf die Kontrollen dargestellt.

Unter Einwirkung von 0,1 µg/ml LTA zeigte sich nach 24 Stunden Inkubation zunächst eine signifikante Proliferationszunahme auf 119% (Abb.10a). Wurde nun ein TLR2-blockierender Antikörper hinzugegeben und die Proliferation unter 0,1 µg/ml LTA-Einwirkung bestimmt, so zeigte sich eine Proliferation von 97%, was dem Kontrollniveau entsprach. Ebenso zeigte sich unter Zugabe des IL-8-blockierenden Antikörpers und selbiger LTA-Einwirkung eine Proliferation von 96%. Die Zugabe eines TLR4-blockierenden Antikörpers ergab hingegen erneut einen Proliferationsanstieg auf 115%. Nach 48 Stunden Inkubation mit 0,1 µg/ml LTA ließ sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der A549-Proliferation auf 118% messen (Abb.10b). Die Blockade von TLR2 und gleichzeitiger LTA-Inkubation führte zu einer gemessenen Proliferation von 103%. Auch unter Blockade von IL-8 sank die Proliferation unter gleichen Bedingungen auf 102%. Unter Zugabe des TLR4-blockierenden Antikörpers zeigte sich ein Proliferationsanstieg auf 112%.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass LTA der Konzentration 0,1 µg/ml nach 24 Stunden und 48 Stunden Inkubation einen signifikanten Proliferationsanstieg von A549 bewirkten. Während sich unter Blockade des TLR4 ebenfalls ein signifikanter Proliferationsanstieg zeigte, der Antikörper also keinen wesentlichen Effekt auf die Proliferation hatte, wurde der LTA-induzierte Proliferationsanstieg sowohl durch Inhibition des TLR2 als auch durch Inhibition von IL-8 aufgehoben.

Ergebnisse

a)



b)

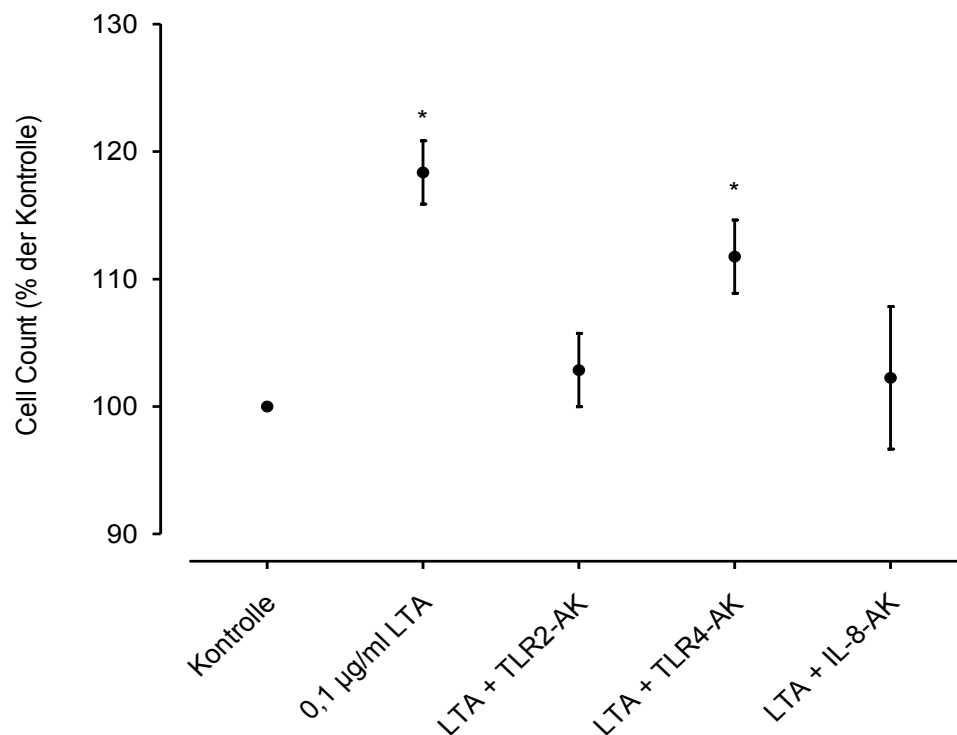


Abb. 10: Proliferation von A549 unter Inkubation von 0,1 µg/ml LTA sowie Blockade von TLR2, TLR4 und IL-8. Messung durch Casy® Cell Count.

a) Messung nach 24 Stunden Inkubation; dargestellt sind Mittelwerte, Streuung dargestellt als SEM. $n \geq 4$; * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

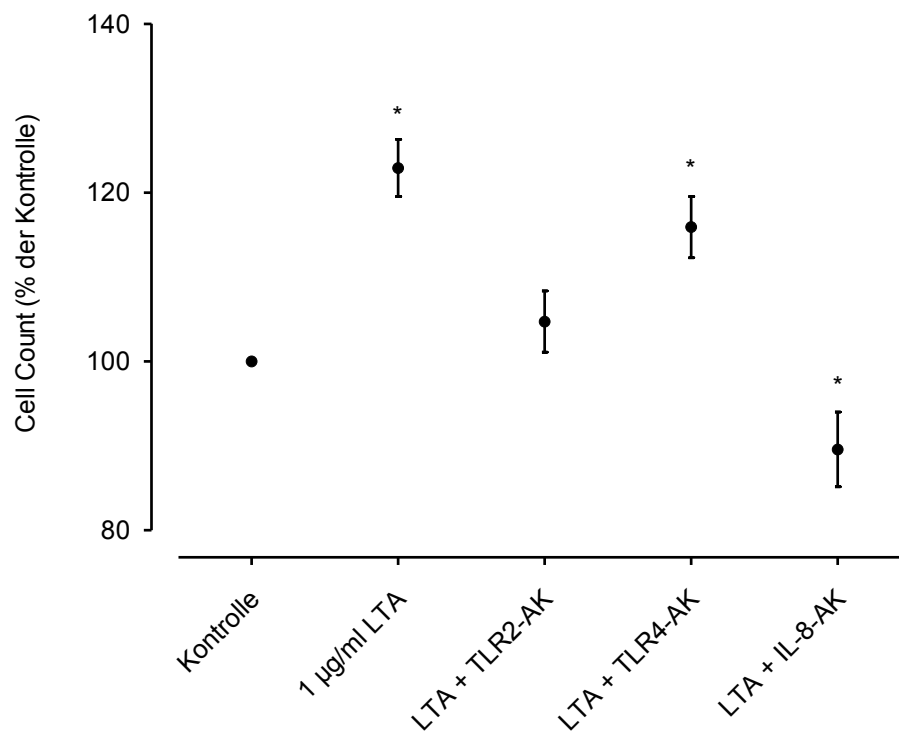
b) Messung nach 48 Stunden Inkubation; dargestellt sind Mittelwerte, Streuung dargestellt als SEM. $n \geq 4$; * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Die Inkubation von A549 mit 1 µg/ml LTA führte nach 24 Stunden zu einem signifikanten Proliferationsanstieg der Zellen auf 123% (Abb.11a). Die Hinzugabe des TLR2-blockierenden Antikörpers unter gleichzeitiger LTA-Inkubation bewirkte eine auf Kontrollniveau messbare Proliferation von 105%. Unter Zugabe des IL-8-blockierenden Antikörpers und LTA-Einwirkung zeigte sich eine auf unter Basalniveau gesenkte Proliferation von 90%. Wurde hingegen TLR4 blockiert und die Zellen mit 1 µg/ml LTA inkubiert, so betrug die Proliferation immer noch 116%.

Ein ähnliches Bild ließ sich unter Inkubation der Zellen mit 1 µg/ml LTA nach 48 Stunden beobachten (Abb.11b). Die alleinige Inkubation mit LTA führte zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation auf 114%. Unter Mitinkubation des TLR2-blockierenden Antikörpers fiel die Proliferation auf 100% ab. Auch die IL-8-Blockade unter LTA-Inkubation führte zu einem Abfall der Proliferation auf das Kontrollniveau (100%). Die Zugabe des TLR4-Antikörpers unter LTA ergab eine erhaltene Proliferation von 112%. Es lässt sich zusammenfassen, dass LTA in der Konzentration 1 µg/ml nach 24 Stunden und 48 Stunden einen Anstieg der A549-Proliferation bewirkten. Dieser LTA-induzierte, signifikante Proliferationsanstieg konnte sowohl durch Inhibition von TLR2 als auch durch Inhibition von IL-8 aufgehoben werden. Die Blockade von TLR4 unter LTA-Inkubation ließ hingegen einen bestehenden signifikanten Proliferationsanstieg beobachten.

Ergebnisse

a)



b)

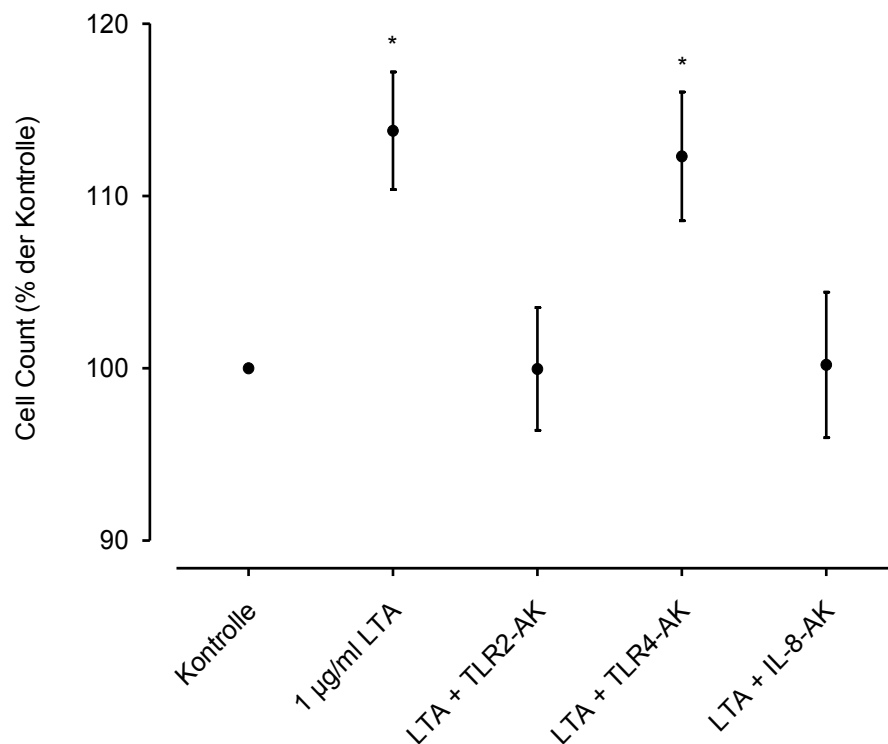


Abb. 11: Proliferation von A549 unter Inkubation von 1 µg/ml LTA sowie Blockade von TLR2, TLR4 und IL-8. Messung durch Casy® Cell Count.

a) Messung nach 24 Stunden Inkubation; dargestellt sind Mittelwerte, Streuung dargestellt als SEM. $n \geq 4$; * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

b) Messung nach 48 Stunden Inkubation; dargestellt sind Mittelwerte, Streuung dargestellt als SEM. $n \geq 4$; * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.6 Zelluläre Interleukin-8-Synthese unter Blockade von TLR2 und TLR4

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die IL-8-Synthese unter Einwirkung von 1 µg/ml LTA sowie gleichzeitiger Blockade des TLR2 bzw. TLR4 zu untersuchen. Die Messungen erfolgten durch ELISA aus den Überständen der wells, die 48 Stunden mit 1 µg/ml LTA und den zu testenden TLR2/4-Antikörpern inkubiert wurden. Die TLR-Antikörper wurden eingesetzt in der Konzentration 0,5 µg/ml. Die Darstellung der IL-8-Synthese erfolgte in der Einheit pg/ml als Δ IL-8, um den LTA-abhängigen Effekt auf die Synthese von IL-8 im Vergleich zu unstimulierten A549-Zellen abzubilden.

Wie Abb.12 zu entnehmen, ließ sich unter Hinzugabe von 1 µg/ml LTA zunächst ein signifikanter Anstieg der IL-8-Synthese um 80 pg/ml beobachten. Die Mitinkubation des TLR2-blockierenden Antikörpers führte hingegen lediglich zu einem Anstieg der IL-8-Synthese um 14 pg/ml im Vergleich zur Kontrolle. Unter Einwirkung von LTA und des TLR4-blockierenden Antikörpers zeigte sich jedoch erneut ein signifikanter Anstieg der IL-8-Synthese um 88 pg/ml. Unter Einsatz des TLR2-Antikörpers fiel der durch 1 µg/ml LTA induzierte Anstieg des gemessenen IL-8 demnach um 66 pg/ml bzw. 83% geringer aus, während sich unter Einsatz des TLR4-Antikörpers keine wesentliche Änderung der IL-8-Synthese beobachten ließ.

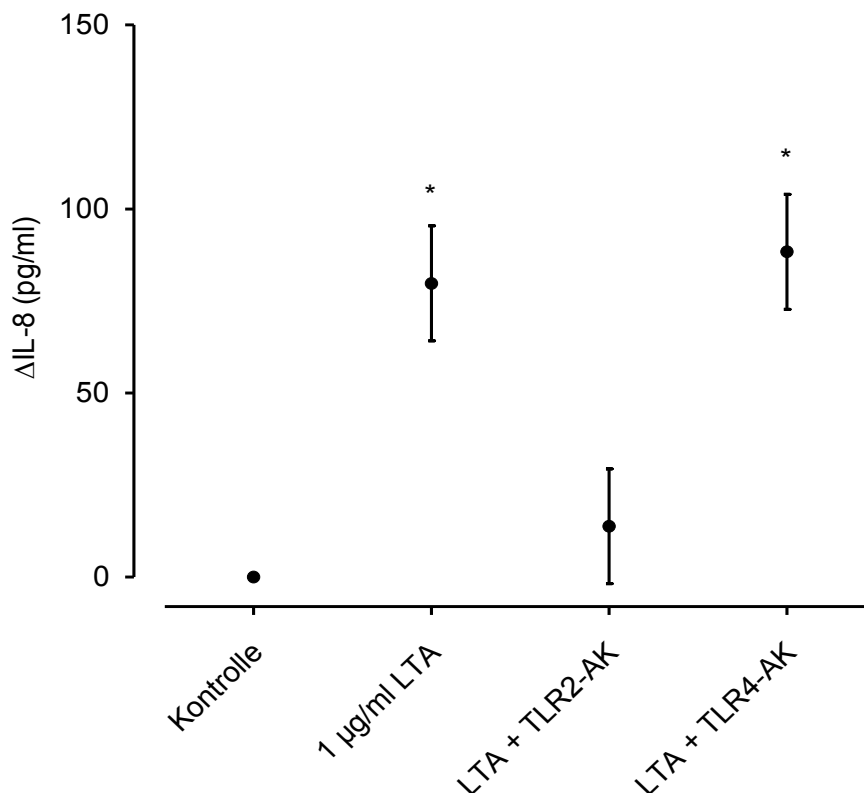


Abb. 12: Zelluläre IL-8-Synthese unter Inkubation von A549 mit LTA sowie Blockade von TLR2 und TLR4. Messung durch ELISA.

Messung des synthetisierten IL-8 nach 48 Stunden Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte. Streuung der Werte dargestellt als SEM; $n \geq 6$. * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4 Diskussion

Patienten mit Lungenkrebs sind in vielfacher Hinsicht gefährdet, an Infektionen des bronchopulmonalen Systems zu erkranken (Berghmans et al. 2003). Das erhöhte Infektionsrisiko im Vergleich zu einem gesunden Organismus ergibt sich nicht zuletzt aus den Erkrankungs- und Therapiekomplikationen, welche z.B. zu rezidivierenden Aspirationspneumonien führen können (Rolston, K. V. I. 2001). Die wachsende Anzahl nosokomialer Infektionen, darunter Infektionen der unteren Atemwege mit einem Anteil von 21,5%, sowie zunehmende Antibiotikaresistenzen gegenüber bakteriellen Pathogenen stellen nicht nur in Deutschland das Gesundheitssystem vor eine Herausforderung (Walger et al. 2013; Robert-Koch-Institut 2012).

Perlin et al. beobachteten, dass pulmonale Infektionen das mediane Überleben von Lungenkrebspatienten zusätzlich einschränken (Perlin et al. 1990). Zusammenhänge zwischen Tumorgenese, Tumorprogression und Entzündung durch Infektion wurden bereits beschrieben und sind Gegenstand aktueller Forschung. In der Literatur wird diskutiert, dass Inflammation die Entwicklung eines Tumors einerseits fördern und andererseits hemmen kann (Nickoloff et al. 2005; Atsumi et al. 2014). So könnten im chronischen Entzündungsgeschehen rekrutierte Immunzellen durch Freisetzung von reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen zur Schädigung wichtiger zellulärer Komponenten beitragen. Aberrant exprimierte oder aktivierte proinflammatorische Moleküle aus der Mikroumgebung des Tumors resultieren in einer intratumoralen Entzündungsreaktion, wodurch Angiogenese, Metastasierung und Invasion des Tumorgewebes begünstigt sein könnten (Kundo und Surh 2008). TLR sind wesentlich an der Erhaltung der Gewebemöostase beteiligt (Chow et al. 2014). Infektion dereguliert jedoch die lokale Gewebemöostase durch Akkumulation verschiedener Immunzellen (Atsumi et al. 2014). Es zeigte sich, dass die von gramnegativen Bakterien stammenden LPS nach Bindung an die Ko-Rezeptoren LBP sowie CD14 über den Komplex TLR4/MD-2 ihr Signal in die Zelle übertragen (Kawai und Akira 2010). Zudem wurde in vitro und in vivo an einem NSCLC-Tiermodell eine LPS-induzierte Proliferation von NSCLC-Zellen beobachtet (Hattar et al. 2013). Auf welche Weise sich LTA von grampositiven Keimen auf die Progression von Tumoren, insbesondere das NSCLC, auswirken, wurde bislang jedoch nicht hinreichend beschrieben. Ebenso ist nicht geklärt, welche Moleküle an der Weiterleitung des LTA-vermittelten Signals in NSCLC-Zellen beteiligt sind.

Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich diese Arbeit mit der Frage, welcher Zusammenhang zwischen der Einwirkung von LTA und der Proliferation von NSCLC-Zelllinien besteht. Weiterhin wurde untersucht, welche Bedeutung TLR2, TLR4 und

IL-8 für die Mediation einer LTA-induzierten Inflammation und die Progression des NSCLC haben.

4.1 LTA stimulieren die Aktivität der getesteten NSCLC-Zelllinien A549 und H226 und wirken proliferationssteigernd

A549 und H226 zeigten unter Einwirkung von LTA eine Zunahme von Proliferation und Zellstoffwechselaktivität. Im BrdU-Assay ließ sich unter Inkubation von A549 mit LTA zudem eine tendenziell gesteigerte DNA-Synthese messen. Proliferationssteigernde Effekte zeigten sich bei Stimulation der Zellen mit LTA in den Konzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1 µg/ml. Während A549 bereits eine deutliche Proliferationssteigerung nach 24-stündiger LTA-Inkubation aufwiesen, zeigte sich die stärkste Proliferationszunahme der H226-Zellen nach 48-stündiger Inkubation. Dieser Unterschied in der Kinetik der zellulären Proliferation könnte zum einen auf einer höheren Proliferationsgeschwindigkeit der A549-Zellen begründet sein (Tsai et al. 1996; Datasheet A549 (ATCC® CCL-185™)). Zum anderen könnten interzelluläre Differenzen auf Rezeptorebene die Affinität der Liganden LTA modulieren oder interzelluläre Differenzen der Transformationskinetik die Proliferation beeinflussen. Hinsichtlich der Dosisabhängigkeit der LTA-induzierten Proliferationszunahme ergaben sich keine Unterschiede zwischen der Adeno- und Plattenepithelkarzinomzelllinie. Auffallend ist, dass 1 µg/ml LTA über eine Inkubationszeit von 72 Stunden an A549-Zellen keinen proliferationssteigernden Effekt mehr beobachten ließen. Dies könnte auf die oben beschriebene, im Vergleich zu H226 differente Ausstattung an zellulären, LTA-bindenden Rezeptoren bzw. auf eine differente LTA-vermittelte Signalweiterleitung zurückzuführen sein, wodurch sich LTA in der gewählten Testkonzentration 1 µg/ml über den längsten Inkubationszeitraum von 72 Stunden an A549 nicht mehr proliferationssteigernd auswirken. Tendenziell zeigten A549 und H226 die deutlichste Proliferationszunahme 48 Stunden nach LTA-Stimulation und unter Einsatz von 0,01 µg/ml LTA sowie 0,1 µg/ml LTA, wobei jedoch insgesamt keine signifikante Dosisabhängigkeit vorlag.

Ebenso stieg die Stoffwechselaktivität beider Zelllinien unter Inkubation mit LTA an. Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse des Casy® Cell Counts mit den Ergebnissen des MTT-Assays lässt sich eine Proportionalität feststellen. Die Aktivität des Zellstoffwechsels und der Zellproliferation korrelieren miteinander bezüglich der getesteten LTA-Konzentrationen. Da beim MTT-Assay im Vergleich zum Cell Count die erste Messung bereits nach 6 Stunden LTA-Inkubation erfolgte und sich zu diesem Zeitpunkt bereits ein Stoffwechselanstieg zeigte, ist ein ebenso früher LTA-Effekt auf die

Proliferation anzunehmen. Der Einsatz des Proliferationsassays BrdU zur Quantifizierung der Neusynthese von DNA an A549 lieferte unter Inkubation aller getesteten LTA-Konzentrationen einen Anstieg der BrdU-Inkorporation im Vergleich zur Kontrolle. Der deutlichste Anstieg wurde auch beim BrdU-Assay unter Inkubation mit 0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml LTA gemessen. Auffällig ist jedoch die Streubreite der Messwerte, welche im Vergleich zu den anderen eingesetzten Proliferationsassays deutlich größer ist und die Ergebnisse des BrdU trotz guter Korrelation mit den Ergebnissen des MTT-Assays und den Ergebnissen des Casy® Cell Counts daher kritisch zu evaluieren sind. Mögliche Gründe für die beobachtete Streubreite der BrdU-Messwerte sind eine eingeschränkte Genauigkeit des Testverfahrens und interexperimentelle Konzentrations- oder Aktivitätsunterschiede der teils lichtempfindlichen, testspezifischen Substanzen. Die stimulative Potenz der LTA, welche sich an der Proliferation, dem Zellstoffwechsel und der DNA-Syntheseaktivität zeigt, könnte sich dennoch auch in vivo auf die Progression des NSCLC auswirken.

In einer Studie von Rezanian et al. an den humanen Zellen des Prostatakarzinoms LNCaP, DU145 und PC3 zeigte sich eine verstärkte Stoffwechselintensität unter Einfluss von LTA (Rezanian et al. 2014). Die Stoffwechselintensität erhöhte sich gleichermaßen unter Einfluss der eingesetzten LTA-Konzentrationen 1 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,01 µg/ml sowie 0,001 µg/ml, eine Konzentrationsabhängigkeit zeigte sich nicht. Die Messung erfolgte durch XTT-Assay, ein Verfahren, wodurch ähnlich wie beim MTT-Assay der Umsatz durch mitochondriale Enzyme metabolisch aktiver Zellen genutzt wird, um die Anzahl vitaler Zellen zu quantifizieren (Berridge et al. 2005). Sowohl Proliferation als auch Zellstoffwechselaktivität unter Einsatz der in der vorliegenden Arbeit getesteten LTA-Konzentrationen 0,01 µg/ml und 0,1 µg/ml zeigten bei Messung ebenfalls keine deutliche Konzentrationsabhängigkeit.

Neben der biologischen Aktivität der LTA (Morath et al. 2002a; Gao et al. 2001) scheint auch die Zellart für die Wirkung des Pathogenitätsfaktors verantwortlich zu sein. Fiedler et al. untersuchten den Einfluss von *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* und *Escherichia coli* sowie ihrer Zellwandkomponenten LTA und LPS auf die Proliferation und Differenzierung adipöser mesenchymaler Stammzellen (adMSC) (Fiedler et al. 2013). Die Behandlung von adMSC mit den hitzeinaktivierten grampositiven Keimen über einen Zeitraum von 14 Tagen führte zu einer verstärkten Proliferation (gemessen durch crystal violet staining), während die Zellstoffwechselaktivität (gemessen durch MTT-Assay) sank. Die Inkubation von adMSC mit LTA in den Konzentrationen 1 µg/ml und 5 µg/ml über denselben Zeitraum hatte jedoch weder Einfluss auf Zellproliferation noch Zellstoffwechselaktivität (Fiedler et al.

2013), passend zu unseren Beobachtungen, dass eher niedrige LTA-Konzentrationen einen pro-proliferativen Effekt hervorrufen.

Dass die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte durch eine spezifische Interaktion der NSCLC-Zelllinien mit LTA und nicht etwa durch eine Kontamination mit LPS hervorgerufen wurden, wird durch folgende Überlegungen untermauert: Wir verwendeten nach der Methode von Morath et al. hergestellte, hoch aufgereinigte LTA, die eine äußerst geringe LPS-Kontamination von unter 6 pg LPS/mg LTA aufweisen (Morath S. et al. 2001). Versuche mit LPS an A549-Zellen zeigten zwar ebenfalls eine Stimulation der Zellproliferation und Zellstoffwechselaktivität, die jedoch - im Gegensatz zu LTA - klar dosisabhängig war und eine andere Kinetik aufwies (Hattar et al. 2013). Die Zellen wurden in der o.g. Studie mit aufgereinigten LPS in den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml inkubiert. Beobachtet wurden die deutlichsten Zunahmen der Zellproliferation sowie des Zellstoffwechsels unter der eingesetzten LPS-Konzentration 10 µg/ml nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Casy® Cell Count bzw. 48 Stunden im MTT-Assay. Anschließend in vivo durchgeführte Versuche an BALB/c Nude Mäusen, welchen subkutan A549-Zellen injiziert wurden, ließen nach vier Tagen ein mehr als dreifach größeres Tumolvolumen unter 10 µg/ml LPS beobachten. Die Gegenüberstellung der erhobenen Ergebnisse macht deutlich, dass sich LTA bereits in niedrigeren Konzentrationen als LPS proliferationssteigernd auf NSCLC-Zellen auswirken. Dies könnte durch eine stärkere Rezeptoraffinität von LTA gegenüber LPS bedingt sein. Möglich ist auch, dass die LTA-bindenden Rezeptoren schon unter Einwirkung von 0,01 µg/ml LTA vollständig besetzt waren. Darüber hinaus scheinen LTA, verglichen mit LPS, erst nach einer längeren Inkubationszeit ihren maximalen proliferationssteigernden Effekt auf NSCLC-Zellen auszuüben. Neben diesen Unterschieden ließ sich die LTA-induzierte Proliferationssteigerung nicht durch einen TLR4-Antikörper, der in der o.g. Studie die LPS-induzierte Zellproliferation hemmte, beeinflussen. Zusammenfassend machen diese Überlegungen deutlich, dass eine Kontamination mit LPS keinesfalls dem proliferationssteigernden Effekt der verwendeten LTA-Präparation zugrunde liegen kann.

Ein etwaiger Beitrag kontaminierender Lipopeptide zu den proliferationssteigernden Effekten der LTA kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Obwohl die immunstimulatorische Potenz von LTA in zahlreichen experimentellen Modellen nachgewiesen wurde (Rockel und Hartung 2012), können auch bakterielle Lipoproteine TLR2-mediert immunstimulatorische Effekte ausüben (Charles et al. 2011). In einigen Arbeiten wurde die Hypothese aufgestellt, dass LTA-mediierte Effekte zumindest teilweise auf eine Kontamination mit Lipoproteinen zurückzuführen seien (Hashimoto et al. 2007; Zähringer et al. 2008). Jedoch induzieren sogar synthetisch hergestellte LTA,

die sicher kontaminationsfrei sind, eine deutliche Aktivierung der Zytokinsynthese (Morath et al. 2002b) und eine aktuelle Untersuchung bewies, dass lipoproteinfreie LTA über einen TLR2-abhängigen Mechanismus die Zytokinsynthese im Vollblut induzieren (Bunk et al. 2010). Angesichts dieser Tatsachen kann die immunstimulatorische Aktivität von LTA nicht bezweifelt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich LTA in vitro proliferationssteigernd auf NSCLC-Zelllinien auswirken. LTA führen gleichermaßen zur Aktivierung der Teilungsaktivität als auch zur Steigerung des Zellmetabolismus sowie der zellulären DNA-Synthese. In steigender Konzentration eingesetzt scheinen LTA hingegen am hier durchgeführten Modell keinen proliferationssteigernden Effekt mehr zu haben. Höhere LTA-Konzentrationen können sich antiproliferativ auswirken, dies zeigte sich in einer von Tian et al. durchgeführten Studie an NSCLC-Zellen und humanen Osteosarkomzellen (Tian et al. 2013). Besonders der proliferationssteigernde Effekt der LTA könnte jedoch für onkologische Patienten, insbesondere Patienten mit NSCLC, von klinischer Relevanz sein. Zur Klärung dieser Fragestellung könnten Experimente in vivo am Tiermodell von medizinischem Nutzen sein.

4.2 Die Stimulation von A549 mit LTA induziert eine verstärkte IL-8-Synthese

Die in dieser Arbeit an A549 durchgeführten Versuche ergaben eine signifikant erhöhte Synthese von IL-8 unter Einfluss von 0,1 µg/ml LTA und 1 µg/ml LTA, die im Zeitverlauf weiter anstieg. Unter Einsatz von 0,01 µg/ml LTA zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der IL-8-Synthese, welcher jedoch geringer ausfiel. Während sich beim Casy® Cell Count insbesondere zu den Messzeitpunkten 24 Stunden und 48 Stunden keine wesentlichen konzentrationsabhängigen Unterschiede zwischen den gemessenen vitalen Zellen feststellen ließen, zeigte sich die unter LTA gemessene IL-8-Synthese im ELISA konzentrationsabhängig. Eine mögliche Erklärung ist neben der bereits in Kap. 4.1 diskutierten Sättigung der LTA-bindenden Rezeptoren ein Proliferationsanstieg als zelluläre Reaktion nach LTA-Stimulation, welcher dem naturwissenschaftlichen Phänomen des sog. Alles-oder-nichts-Prinzips folgt (Adrian 1914). Demnach führen LTA in niedriger Testkonzentration bereits zu einem vergleichbar ausgeprägten Anstieg der Proliferation wie LTA in der höher gewählten Konzentration 1 µg/ml, während die Zellen nach Steigerung der LTA-Konzentration hingegen weiterhin mit einem Anstieg der IL-8-Synthese reagieren.

In Gewebeproben des NSCLC wurde eine im Vergleich zum gesunden Lungengewebe verstärkte Produktion von IL-8 gemessen (Smith et al. 1994). Ebenso wurde in einer durch Rafrafi et al. durchgeführten Fall-Kontroll-Studie eine deutlich erhöhte IL-8- mRNA

Expression bei NSCLC-Patienten als bei Gesunden beobachtet (Rafrafi et al. 2013). Durch Einsatz von RT-PCR und ELISA gelang Zhu et al. der Nachweis, dass NSCLC-Zellen, darunter A549, eine hochregulierte IL-8-Synthese aufweisen (Zhu et al. 2004). Da das Ausmaß der Produktion von IL-8 in vivo mit dem Krankheitsstadium beim NSCLC korreliert (Rafrafi et al. 2013), stellt sich die Frage, wie sich die erhöhte IL-8-Synthese in NSCLC-Proben pathophysiologisch erklären lässt. Die hier beobachtete LTA-induzierte IL-8-Freisetzung aus NSCLC-Zellen stellt eine mögliche Erklärung dar. Die quantitativ bedeutendste zelluläre Quelle für IL-8 stellen in vivo jedoch nicht epitheliale, sondern myeloide Zellen, besonders monozytären Ursprungs, dar. In reseziertem Gewebe von Patienten mit NSCLC wurden neben einer großen Anzahl an Lymphozyten vor allem sog. tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) nachgewiesen (Kataki et al. 2002). Die Anzahl der im Tumorgewebe enthaltenen TAMs korrelierte signifikant mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, da die Expression von Genen, die mit Zellinvasion, Angiogenese, Remodeling der extrazellulären Matrix und Metastasen in Verbindung gebracht werden, hochreguliert wurde (Chung et al. 2012; Wang et al. 2011). Weiterhin zeigte sich in NSCLC-Resektionsproben, dass eine erhöhte Anzahl TREM-1-positiver Makrophagen im Tumorgewebe mit ungünstigem klinischen Outcome verbunden ist (Ho et al. 2008). TREM-Proteine (triggering receptors expressed on myeloid cells) wurden beschrieben als Rezeptoren auf der Zelloberfläche myeloider Zellen aus der Familie der Immunglobuline (Bouchon et al. 2001). Yuan et al. beobachteten, dass die Expression von TREM-1 in TAMs des NSCLC hochreguliert ist und A549 die Expression des TREM-1-Signals und des TREM-1-Proteins in Makrophagen induzieren (Yuan et al. 2014). Zudem scheinen TREM-1 und TLR miteinander zu interagieren, da TLR-Liganden wie LTA und LPS zu einer signifikanten Hochregulierung von TREM-1 führten (Bleharski et al. 2003). Bleharski et al. beobachteten, dass TREM-1 die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, darunter IL-8, triggern. Zellen wie Makrophagen oder Neutrophile, die sowohl TREM-1 als auch TLR exprimieren, könnten auf diese Weise eine synergistische, stärkere Immunantwort auslösen (Ornatowska et al. 2007). So zeigte eine Studie unserer Arbeitsgruppe, dass eine Koinkubation neutrophiler Granulozyten mit A549-Zellen zu einer Potenzierung der LPS- und LTA-induzierten IL-8-Synthese führt (Grandel et al. 2009).

Angeborene Immunität, Tumorumgebung und Zellmetabolismus interagieren in komplexer Weise miteinander. Entsprechend der umgebungsabhängigen Produktion von Zytokinen scheint IL-8 im NSCLC ein entscheidender Regulationsfaktor zu sein und pro-tumoral zu wirken. Zusammenfassend wurde in vitro beobachtet, dass LTA als TLR-Liganden im NSCLC direkt an A549-Zellen die Synthese des proinflammatorischen Zytokins IL-8 induzieren (s. Abb.13). Darüber hinaus könnten LTA in vivo auch indirekt

über TREM-1-aktivierte Makrophagen und TREM-1-aktivierte Neutrophile zur Produktion proinflammatorischer Zytokine beitragen.

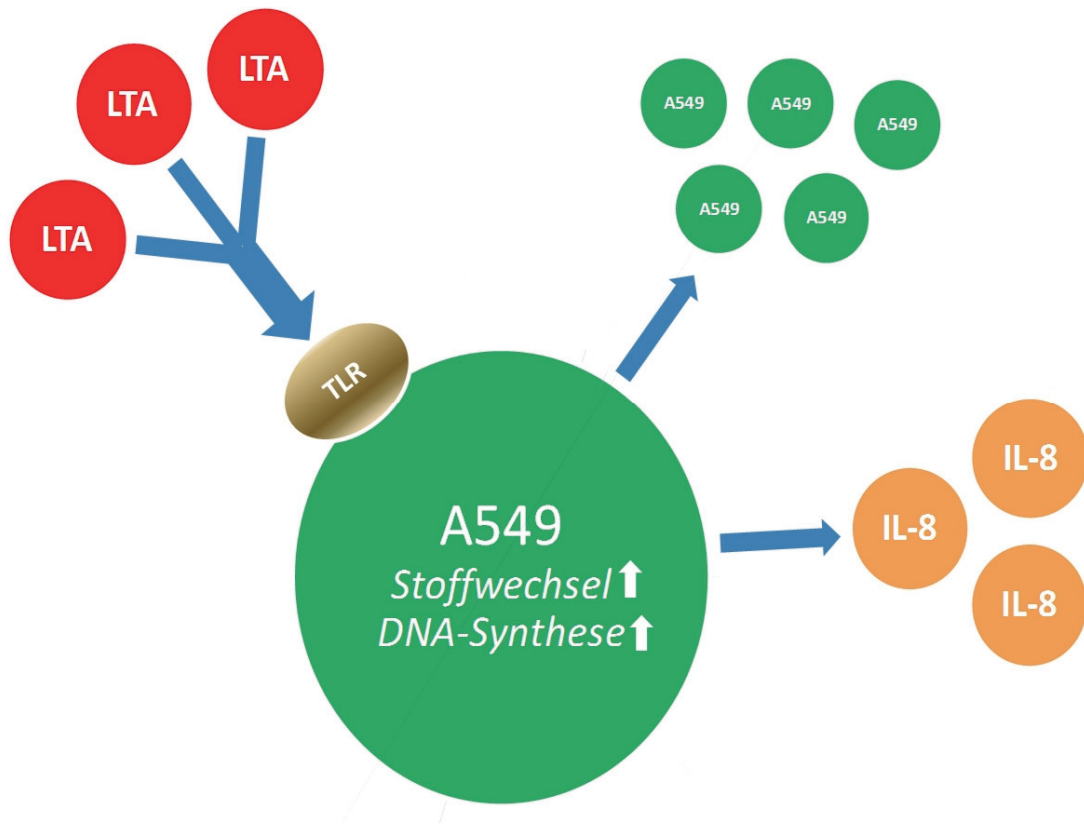


Abb. 13: Stimulation von A549-Zellen mit LTA bewirkt Anstieg von Proliferation, Zellstoffwechsel und IL-8-Synthese.

3.3 Klinische Relevanz einer hochregulierten IL-8-Synthese für Patienten mit NSCLC – neue Therapieoptionen?

In Experimenten an SCID-Mäusen ließ sich beobachten, dass die voranschreitende Progression des humanen A549-NSCLC mit dem Ausmaß der IL-8-Synthese korreliert (Arenberg et al. 1996). Darüber hinaus untersuchten Arenberg et al., wie sich der Einsatz von Antikörpern gegen IL-8 auf das NSCLC auswirkt. Es zeigten sich eine Reduktion der Tumorgröße um 40% sowie ein Rückgang der Gefäßdichte des Tumors und der tumorassoziierten Angiogenese. Auch wurde eine verminderte Metastasierung in die Lunge beobachtet (Arenberg et al. 1996). Ebenso kamen Yuan et al. in ihrer Studie zu der Schlussfolgerung, dass die Expression von IL-8-mRNA mit fortgeschrittenem Tumorstadium, fernen Lymphknotenmetastasen, dem Ausmaß der Tumorangiogenese, einer verminderten Überlebensrate und Frührezidiven assoziiert ist (Yuan et al. 2000). Weiterhin beobachteten sie einen Zusammenhang zwischen einer mit ungünstiger

Prognose einhergehenden, abberierenden Expression des Tumorsuppressorgens p53 (Quinlan et al. 1992) und der Transkription von IL-8-mRNA (Yuan et al. 2002).

Progressive Tumorangiogenese sowie voranschreitende Tumordinvasion durch hochregulierte IL-8-Synthese wurden u.a. beschrieben beim Melanom (Huang et al. 2002), ER-negativem Mammakarzinom (Yao et al. 2007), Prostatakarzinom (Murphy et al. 2005), Blasenkarzinom (Karashima et al. 2003) und Pankreaskarzinom (Shi et al. 1999). Mian et al. beobachteten unter Einsatz des humanen IL-8 Antikörpers ABX-IL8 einen Rückgang von Proliferation und Invasion des humanen Blasenkarzinoms (Mian et al. 2003). Auch in Epithelzellen der Lunge zeigte sich unter Einsatz anti-inflammatorischer Medikamente wie Dexamethason eine zeit- und dosisabhängige Inhibition der Expression von IL-8-mRNA (Chang et al. 2001).

In Hinblick auf die vorliegenden Versuchsergebnisse sowie auf die Tatsache, dass Neovaskularisationsprozesse wesentlich zum Tumorwachstum und zur Metastasenbildung beitragen, lässt sich sagen, dass eine IL-8-neutralisierende Medikation für die Behandlung von Patienten mit NSCLC bzw. Patienten mit NSCLC und begleitender bakterieller Infektion von therapeutischer Relevanz sein könnte.

4.4 TLR2-abhängiger LTA-Effekt auf die zelluläre Proliferation und Zytokinsynthese

In den durchgeführten Versuchen zeigte sich eine signifikante Neutralisierung des unter LTA beobachteten proliferationssteigernden Effektes unter Blockade von TLR2 sowie IL-8. Die Blockade von TLR4 führte zu keiner Abschwächung der LTA-vermittelten Proliferationssteigerung. Im ELISA zeigte sich außerdem eine signifikante Aufhebung der LTA-vermittelten Steigerung der IL-8-Synthese durch Blockade von TLR2. Die TLR4-Blockade hingegen führte zu keiner Absenkung der IL-8-Synthese. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das proliferationssteigernde Signal der LTA auf A549 vor allem über TLR2 mediiert wird. Zudem scheint die LTA-induzierte Synthesesteigerung von IL-8 ebenfalls über TLR2 mediiert zu werden, da sich bei Hemmung von TLR2 die LTA-induzierte Steigerung der IL-8-Synthese nahezu vollständig aufheben ließ. Wie bereits unter 4.1. erwähnt, belegt die Ineffizienz des verwendeten TLR4-Antikörpers, der in zahlreichen Studien einen inhibitorischen Effekt auf LPS-mediierte Zellaktivierung hatte (Hattar et al. 2013; Shang et al. 2014), dass die beobachteten proliferationssteigernden Effekte der LTA nicht auf eine etwaige LPS-Kontamination zurückzuführen sind.

In einer Studie von Han et al. konnten TLR2- und CD14-exprimierende mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) durch LTA zur vermehrten Produktion von TNF- α

stimuliert werden (Han et al. 2003). Durch Blockade von TLR1 und TLR2, nicht jedoch TLR4, gelang eine Inhibition der Zytokinproduktion. Mittels Durchflusszytometrie erfolgte die Quantifizierung des NF- κ B-abhängigen Reportergens CD25 (Fu et al. 2013). Auf diese Weise wurde eine gesteigerte NF- κ B-Aktivität unter LTA-Einwirkung festgestellt (Han et al. 2003). Schröder et al. führten Versuche mit humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) sowie Chinese Hamster Ovar (CHO-) Zellen durch, welche mit humanen CD14- sowie MD-2- und/oder TLR2/4-codierenden Plasmiden transfiziert wurden. Die Quantifizierung der zellulären Antwort mittels Messung der NF- κ B-Aktivität erfolgte durch luciferase reporter assay und ergab eine TLR2-abhängige Aktivierung von NF- κ B durch LTA, während die Expression von TLR4 nicht ausreichte (Schröder, N. W. J. et al. 2003). Die weitere, downstream dem TLR2 zuzuordnende Signaltransduktionskaskade umfasst die Aktivierung diverser intrazellulärer Kaskaden wie IRAK-1, IRAK-4, IRAK-6, TRAF-6 und MyD88 (Cho et al. 2007).

TLR2 scheint mit weiteren Signalmolekülen wie CD14, TLR6 und CD36 zu kooperieren (Brandt et al. 2013; Schröder, N. W. J. et al. 2003; Hoebe et al. 2005). Um die komplette post-Rezeptor-Signaltransduktion nach Stimulation von NSCLC-Zellen mit LTA aufzudecken, ist die aktuelle Datenlage sicher nicht ausreichend. Die Beobachtung eines TLR2-abhängigen LTA-Effektes auf die NSCLC-Zellen A549 sowie die diskutierten Studienergebnisse verdeutlichen aber den Stellenwert des TLR2 für die funktionierende zelluläre Interaktion des bakteriellen Pathogenitätsfaktors und extrazellulären Liganden LTA. Interessanterweise könnte dieser Interaktion auch in vivo im Lungenkarzinom eine funktionelle Bedeutung zukommen, da sich in den bronchio-alveolären Lavagen im Lungenkarzinom erhöhte Spiegel von TLR2-mRNA im Vergleich zu gesunden Probanden nachweisen ließen (Samara et al. 2012). Auch in anderen soliden Tumoren, wie Magen- und Mammakarzinom, scheint die Aktivierung von TLR2 eine entscheidende pathogenetische Rolle zu spielen (Luppi et al. 2007).

4.5 Autokrine Rolle von IL-8 bei der LTA-induzierten Zellproliferation – mögliche Mechanismen

In Kap. 4.3 wurde bereits erläutert, dass in vivo ein Zusammenhang zwischen der Synthese von IL-8 und der tumorassoziierten Angiogenese beim NSCLC besteht. Dies erklärt jedoch nicht den in vitro beobachteten IL-8-abhängigen Proliferationsanstieg unter LTA-Inkubation. Luppi et al. zeigten, dass das von NSCLC-Zellen freigesetzte IL-8 zu einer Transaktivierung zellulär exprimierter EGF-Rezeptoren (EGFR) führt (Luppi et al. 2007). Eine Überexpression des EGFR geht beim NSCLC mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer schlechten Prognose einher (Hirsch et al. 2003; Kurie et al. 1996; Mok et al. 2014). In klinischen Studien mit den EGFR-inhibierenden Medikamenten Afatinib (Kato et al. 2015), Gefitinib (Mok et al. 2009), Cetuximab (Pirker et al. 2009) und Erlotinib (Shepherd et al. 2005) wurden längere Überlebenszeiten beobachtet, wobei insbesondere Patienten mit aktivierenden Mutationen des EGFR von diesen EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren profitierten. Unter „Transaktivierung“ ist zu verstehen, dass ein Rezeptor nicht primär durch seinen ursprünglichen Liganden (beim EGFR: EGF und TGF- α) aktiviert wird, sondern dass die Aktivierung sekundär intrazellulär durch Amplifikation von post-Rezeptor-Signaltransduktionswegen oder sekundär auf Rezeptorebene durch Induktion des ursprünglichen Liganden durch einen anderen Mediator (wie IL-8) erfolgt (Wang et al. 2015).

In Experimenten an A549-Zellen induzierten LPS als Endotoxine gramnegativer Bakterien einen zellulären Proliferationsanstieg, welcher sich durch Blockade des EGF-Rezeptors signifikant aufheben ließ (Hattar et al. 2013), was über eine Transaktivierung durch endogen gebildetes IL-8 und PGE2 erklärt wurde. Eine Erklärung könnte die EGFR-mediierte und beim NSCLC bekannte Aktivierung von Mcl-1, ein zur anti-apoptotischen Proteinfamilie Bcl-2 gehörender Faktor (Thomas et al. 2010), sein (Kim et al. 2013). Da neben LTA auch LPS in vitro A549-Zellen zu einer verstärkten IL-8-Synthese stimulieren (Grandel et al. 2009), könnte der beobachtete LTA-induzierte und IL-8-abhängige Proliferationsanstieg auf eine Aktivierung von EGF-Rezeptoren im Sinne einer autokrinen Stimulation durch sog. „Rezeptortransaktivierung“ zurückzuführen sein. Die dem aktivierten EGFR nachgeschaltete Signaltransduktion umfasst neben der Aktivierung des MAP-Kinase-Pathways die Aktivierung von STAT3 und STAT5, was letztendlich in einer gesteigerten Proliferation und verminderten Apoptose mündet (Janku et al. 2011).

Laut Li et al. ist der pro-angiogenetische Effekt des IL-8 auf eine gesteigerte Proliferation CXCR1- und CXCR2-exprimierender Endothelzellen zurückzuführen (Li et al. 2003). Unter Einwirkung von IL-8 wiesen die Zellen neben einer niedrigeren Apoptoserate und

einem gesteigertem Survival eine signifikant erhöhte Produktion der Matrix-Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 sowie eine vermehrte Migration auf. In der RT-PCR zeigte sich unter IL-8 eine höhere mRNA-Expression der anti-apoptotischen Gene Bcl-2 und Bcl-x_L im Verhältnis zu der mRNA-Expression der pro-apoptotischen Gene Bax und Bcl-x_S. Auch in der Western Blot Analyse ließ sich eine IL-8-abhängige Hochregulation von Bcl-2 und Downregulation von Bax beobachten (Li et al. 2003). Da CXCR1 und CXCR2 nicht nur auf Lungenepithelzellen und infiltrierenden Immunzellen exprimiert werden (Gras et al. 2010), sondern auch auf NSCLC-Zellen nachgewiesen wurden (Zhu et al. 2004), ist zu vermuten, dass der proliferationssteigernde Effekt von IL-8 beim NSCLC über eine Inhibition der Apoptose vermittelt wird. Durch Einsatz des IL-8-Analogons CXCL8₍₃₋₇₂₎K11R/G31P zur selektiven Antagonisierung von CXCR1 und CXCR2 gelang Khan et al. eine Suppression der A549-Proliferation (Khan, M. N. et al. 2015). Der CXCR1/2-Antagonist führte zu einer gesteigerten zellulären Apoptose durch vermehrte Expression der pro-apoptotischen Gene Poly ADP ribose polymerase (PARP), Caspase-8 und Bax und Herabregulierung des anti-apoptotischen Bcl-2.

Ein indirekter Mechanismus, über den LTA das Tumorstadium fördern könnten, wurde von Baroni et al. beschrieben. Es wurde beobachtet, dass LTA sowie Protein-A von *Staphylococcus aureus* zu einer verstärkten Freisetzung des von humanen dermalen Fibroblasten gebildeten hepatocyte growth factor (HGF) führen. Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β , welches im Blut von aktivierten Monozyten produziert wird, verstärkte diesen Effekt zusätzlich. HGF ist als Proliferationsfaktor epithelialer Zellen für Reparaturmechanismen der Haut verantwortlich und wird durch LTA, wie Baroni et al. zeigten, hochreguliert (Baroni et al. 1998).

Zusammenfassend könnten LTA den in vitro beobachteten proliferationssteigernden Effekt auf A549 einerseits durch direkte zelluläre Stimulation und andererseits indirekt IL-8-vermittelt durch zelluläre Autostimulation von EGFR und CXCR1/2 bewirken (s. Abb.14). Ursächlich für die gesteigerte Proliferation scheint insbesondere eine veränderte Genexpression zu sein, die zu einer längeren Überlebenszeit der A549-Zellen führt.

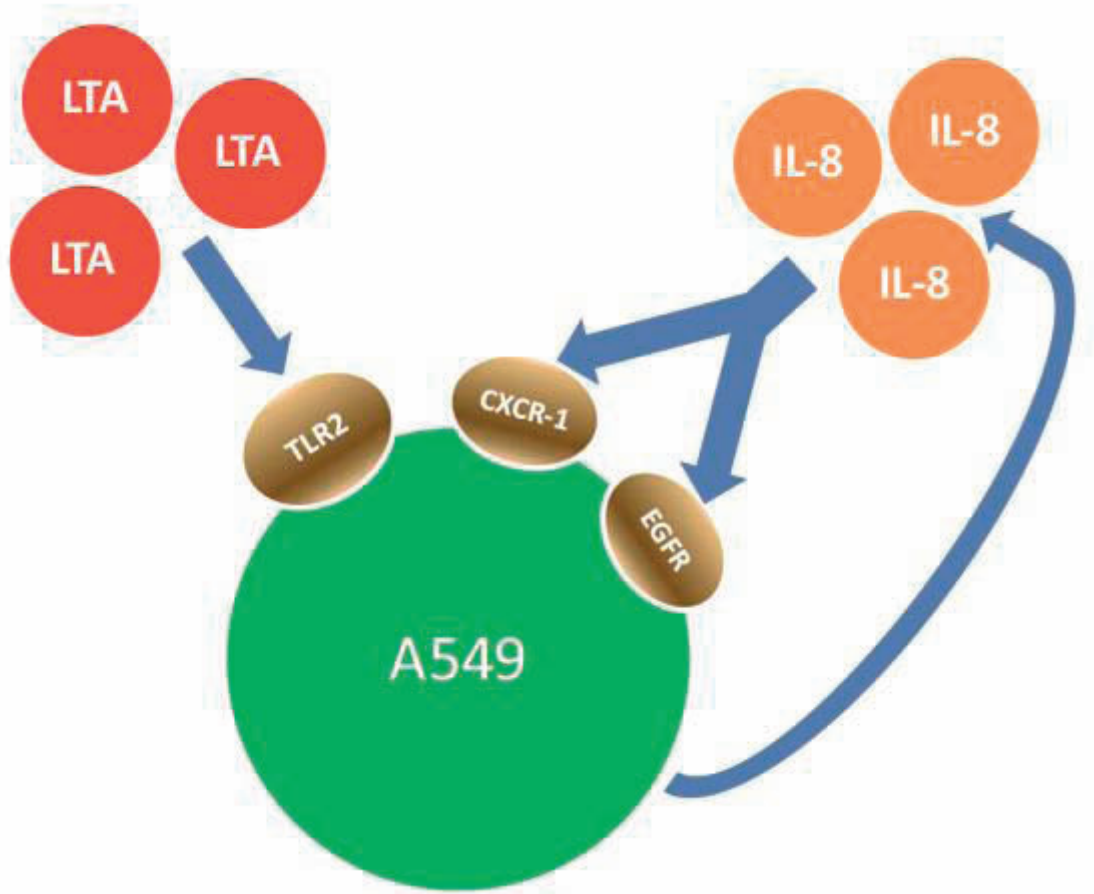


Abb. 14: Interaktion von A549 mit LTA. Freisetzung von IL-8 und autokrine Stimulation von A549 durch Bindung von IL-8 an EGFR sowie an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR1.

4.6 Weitere mögliche Mechanismen der LTA-induzierten Proliferationssteigerung – potentielle Rolle der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, STAT3 und AP-1

Nachdem gezeigt wurde, dass der proliferationssteigernde Effekt der LTA auf A549-Zellen durch TLR2 mediiert wird und die induzierte Freisetzung von IL-8 in vitro die Tumorprogression positiv beeinflusst, sollen im Folgenden kurz weitere mögliche Mechanismen der LTA-induzierten Proliferationssteigerung diskutiert werden.

In Interaktion mit den Adapterproteinen MyD88 und Mal führt die Ligandenbindung an TLR2 u.a. zur Aktivierung der I κ B kinase (IKK) (Liljeroos et al. 2007). IKK phosphoryliert I κ B, das Bindungsprotein von NF- κ B, welches anschließend durch Ubiquitinierung im 26S Proteasom abgebaut wird (Lin und Karin 2003). NF- κ B wird daraufhin in den Nukleus transloziert, wo es durch Interaktion mit κ -Elementen die Transkription beeinflusst (Brown et al. 1995). Die transkriptionale Aktivität von NF- κ B kann zudem I κ B-unabhängig durch Phosphorylierung der Untereinheit p65 reguliert werden (Vermeulen

et al. 2002). Lee et al. zeigten an glatten Muskelzellen der Trachea, dass LTA, vermittelt durch TLR2, PI3K/Akt und MAPK, die Phosphorylierung von p65 sowie die Translokation von NF- κ B in den Nukleus stimulieren (Lee et al. 2010). Eine durch diese Translokation ermöglichte Signalweiterleitung durch NF- κ B ließ in einer Studie von Zhang et al. eine vermehrte Expression des anti-apoptotischen Gens Bcl-2 beobachten (Zhang et al. 2012). Ebenso zeigten Luo et al. an der Kolonadenokarzinom-Zelllinie CT26, dass eine LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung zu einer Überexpression der anti-apoptotischen Faktoren Bcl-x_L, cIAP1 und cIAP2 führen (Luo et al. 2004).

Durch Bindung an TLR2 führen LTA IRF- und IFN- α -vermittelt zur Aktivierung von STAT3 (Liljeroos et al. 2008). Aktiviertes STAT3 bewahrt Zellen vor Apoptose und fördert die Progression des Zellzyklus und der Metastasierung (Groner et al. 2008). Haura et al. untersuchten 176 Proben von operativ entfernten NSCLC auf die Aktivität von STAT3. Proben mit Überexpression von phosphoryliertem STAT3 (pSTAT3) wiesen eine niedrigere Apoptoserate auf. Darüber hinaus exprimierten Zelllinien mit mutierten EGFR höhere Werte an pSTAT3 (Haura et al. 2005). Es wurde beschrieben, dass der anti-apoptotische Effekt von STAT3 durch die vermehrte Expression von Genen wie Bcl-x_L (Catlett-Falcone et al. 1999), Bcl-2 (Real et al. 2002), Mcl-1 (Epling-Burnette et al. 2001) und survivin (Aoki et al. 2003) reguliert wird.

Neben NF- κ B und STAT3 ist auch AP-1 als Transkriptionsfaktor an der homöostatischen Regulation von Zelltod und Zellsurvival beteiligt. Die transkriptionale Aktivierung des AP-1-Komponentenproteins c-Jun induziert besonders die Expression anti-apoptotischer Genprodukte und fördert damit die Zellproliferation (Shaulian und Karin 2002). In von Tang et al. durchgeführten Versuchen an LTA-stimulierten humanen Synovialfibroblasten ließ sich eine gesteigerte, TLR2-medierte, nukleäre Akkumulation von phosphoryliertem (p)-c-Jun und p-p65 sowie eine gesteigerte Promoter-Aktivität von AP-1 und NF- κ B im Luciferase-Assay beobachten (Tang et al. 2010). In Versuchen an humanen Epithelzellen des Mittelohres stellten Tang et al. eine erhöhte Expression von MMP-9 unter LTA-Einwirkung fest (Tang et al. 2010). Auch beim NSCLC ist eine LTA-induzierte Stimulation der c-Jun- und MMP-9-Expression denkbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass LTA über eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, STAT3 und AP-1 die Expression anti-apoptotischer Faktoren fördern und auf diese Weise beim NSCLC die Tumorzellproliferation stimulieren könnten (s. Abb.15). Die immunhistochemische Untersuchung von Proben aus 94 operierten NSCLC-Patienten zeigte, dass eine Bcl-2-Überexpression mit einer kürzeren Überlebenszeit und einer Unterexpression von Bax korreliert (Groeger et al. 2004). Das insbesondere durch p53 als wichtigen Regulator des Zellzyklus aufrechterhaltene Gleichgewicht aus DNA-Reparatur sowie programmiertem Zelltod,

gesteuert durch Transkription pro-apoptotischer (z.B. Bax) und anti-apoptotischer Gene (Robles et al. 2002) scheint durch LTA moduliert zu werden. Da über die Aktivierung des TLR2-Signalweges auch eine lokale Immunsuppression durch gesteigerte Produktion von NO und IL-6 möglich ist, könnte unter LTA-Einwirkung zudem die Gewebepenetration der Tumorzellen in vivo begünstigt werden (Huang et al. 2007).

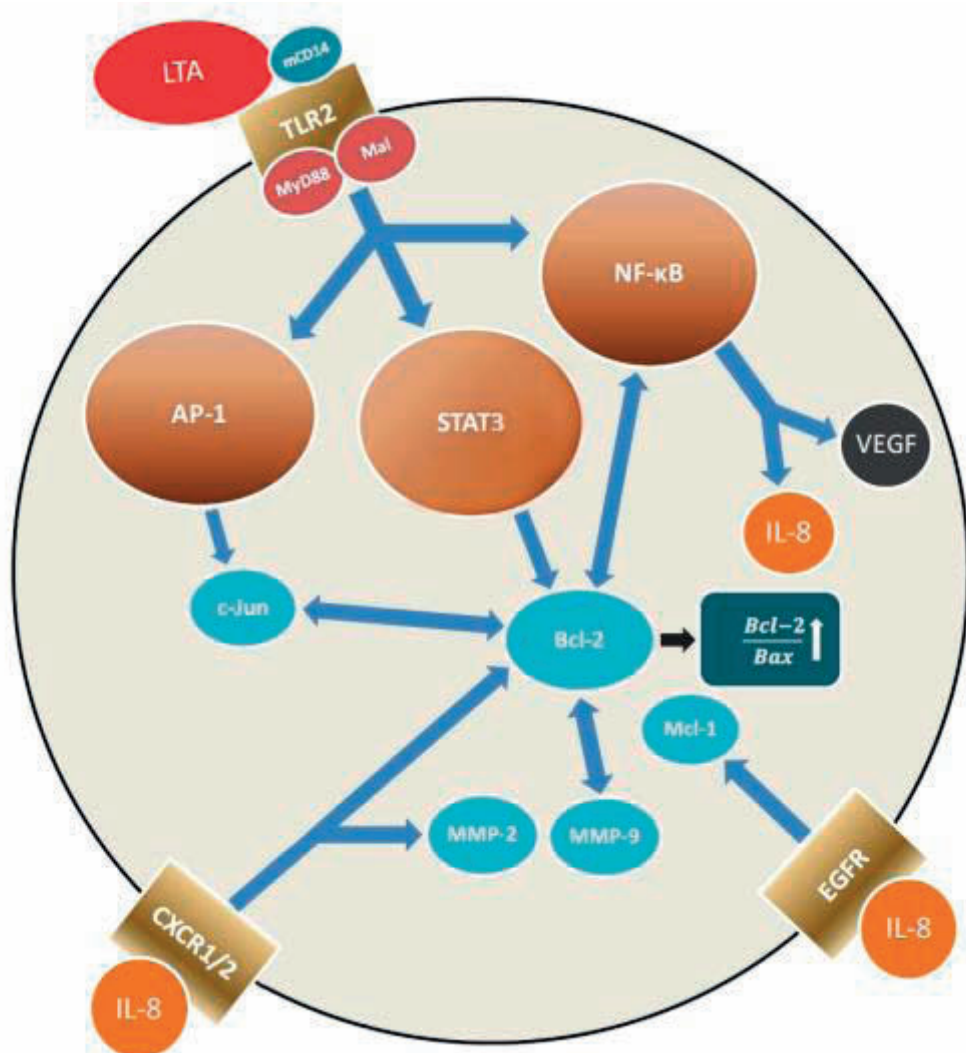


Abb. 15: Effekt von LTA und IL-8 auf A549-Zellen. Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB, STAT3 und AP-1 und Produktionsanstieg anti-apoptotischer Genprodukte wie z.B. Bcl-2, Mcl-1, c-Jun und MMP2/9. Vergrößerung des Quotienten aus anti-apoptotischen zu pro-apoptotischen Genproduktion (z.B. Bax).

4.7 Klinischer Ausblick

Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass LTA als Pathogenitätsfaktoren grampositiver Bakterien in vitro stimulatив auf Proliferation und Stoffwechselaktivität von NSCLC-Zellen wirken. Die Bedeutung pulmonaler Infektionen für das mediane Überleben von LC-Patienten wurde bereits in Kap. 1.2 thematisiert (Huang et al. 2014; Berghmans et al. 2003; Perlin et al. 1990). Es liegt nahe, dass LTA die Tumorprogression auch in vivo beschleunigen und damit den Krankheitsverlauf von NSCLC-Patienten beeinflussen. Eine konsequente antiinfektive Therapie ist auf jeden Fall indiziert. Zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen, insbesondere komplexer Interaktionen zwischen NSCLC-Zellen, LTA und Zellen des Immunsystems, könnten Experimente am Tiermodell weiteren Aufschluss geben und von klinischem Nutzen sein. In Hinblick auf die Verbesserung von Therapiestrategien sind Auswirkungen der lokalen Immunantwort sowie der systemischen Inflammation auf die Mikroumgebung solider Tumore und auf das klinische Outcome von wachsendem Interesse (Diakos et al. 2014). Neben der Gabe von Aspirin (Chia et al. 2012), NSAIDs und COX2-Inhibitoren (Diakos et al. 2014) werden zur anti-inflammatorischen Behandlung von Krebspatienten z.B. der Einsatz von selektiven Immunmodulatoren wie z.B. das IL-6-inhibierende Tocilizumab (Ando et al. 2013), das CCL2-, IL-6- und IL-8-blockierende Trabectedin (Germano et al. 2011) sowie STAT3- und FGFR-Inhibitoren (Fagard et al. 2014; Dieci et al. 2013) diskutiert.

Im Rahmen von Studien wurde der Einsatz TLR-antagonisierender Medikamente bislang bspw. bei kardiovaskulären Erkrankungen (Frantz et al. 2007), Sepsis (Bang et al. 2015) und experimenteller Colitis (Fort et al. 2005) getestet. Zur topischen Behandlung von Hautkrebs kommt der immunmodulatorische, antitumoral wirkende TLR7/8-Agonist Imiquimod (Aldara®) zum Einsatz (Schön et al. 2006). Experimentelle und klinische Erfahrungen mit der Anwendung indirekter und direkter TLR-Inhibitoren bei onkologischen Erkrankungen wie dem NSCLC sind bisher jedoch unzureichend (Pinto et al. 2011). Die Ergebnisse der Versuche an A549-Zellen zeigen, dass sowohl eine selektive TLR2- als auch eine IL-8-Blockade die Progression von NSCLC-Zellen unter LTA-Einfluss verlangsamen. Um die Bedeutung dieser Beobachtungen für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien beim NSCLC beurteilen zu können, könnten Experimente in vivo weiteren Aufschluss geben.

5 Zusammenfassung

Infektionen mit grampositiven Bakterien beeinträchtigen die Überlebenszeit von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC). Lipoteichonsäuren (LTA) lassen sich als Bestandteil der Zellmembran grampositiver Bakterien den sog. pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) zuordnen und wirken proinflammatorisch. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich LTA von *Staphylococcus aureus* in vitro auf die Proliferation der humanen Adenokarzinomzelllinie A549 und Plattenepithelkarzinomzelllinie H226 auswirken. Die Zellen wurden über verschiedenen lange Zeiträume mit LTA inkubiert und die Proliferation zum einen direkt durch automatisierte Zellzählung und zum anderen indirekt durch Bestimmung des Zellstoffwechsels sowie der Aktivität der zellulären DNA-Synthese mittels MTT- und BrdU-Assay quantifiziert. Des Weiteren wurde durch ELISA die Synthese von IL-8 unter LTA-Inkubation gemessen. Durch Einsatz monoklonaler Antikörper wurden die zellulären Oberflächen- und Signalmoleküle TLR2, TLR4 sowie IL-8 selektiv inhibiert und deren Effekt auf die Proliferation von A549 unter LTA bestimmt. Auch wurde die IL-8-Synthese unter TLR2- und TLR4-Blockade und LTA-Inkubation gemessen. Bereits unter Inkubation mit LTA in niedriger Dosierung ließ sich an A549 und H226 eine signifikante Zunahme von Proliferation und Zellmetabolismus beobachten. Auch die DNA-Syntheseaktivität wurde durch LTA leicht stimuliert. Dosisabhängig zeigte sich eine im Inkubationsverlauf ansteigende, signifikant vermehrte Synthese von IL-8 nach Stimulation mit LTA. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass sich der LTA-induzierte Proliferationsanstieg sowohl durch TLR2- als auch durch IL-8-neutralisierende Antikörper aufheben lässt. Darüber hinaus zeigte sich der LTA-induzierte IL-8-Anstieg TLR2-abhängig.

Die Interaktion von LTA mit NSCLC-Zellen könnte auch in vivo für die Progression des NSCLC von klinischer Bedeutung sein. LTA medieren ihren proliferationssteigernden Effekt durch zelluläre Stimulation von TLR2 und Freisetzung von IL-8. Da auch IL-8 proliferationssteigernd wirkt, könnte das Tumorstadium auf diese Weise parakrin und autokrin stimuliert werden. Da IL-8 zudem pro-angiogenetisch wirkt, könnten LTA in vivo die Vaskularisierung des Tumorgewebes begünstigen.

Komorbide Patienten, welche an einem NSCLC und bspw. an einer Pneumonie leiden, könnten auf diese Weise von einer beschleunigten Tumorstadium betroffen sein. Der Einsatz von TLR2- und IL-8-Inhibitoren könnte den LTA-induzierten Proliferationsanstieg der Tumorzellen auch in vivo reduzieren.

6 Summary

Infections caused by grampositive bacteria impair prognosis of patients suffering from non-small-cell lung cancer (NSCLC). As an integral cell wall component of grampositive bacteria lipoteichoic acids (LTA) belong to the so-called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and function proinflammatory. The aim of this work was to investigate the effect of LTA from *Staphylococcus aureus* on tumor proliferation in vitro using the human adenocarcinoma cell line A549 and squamous cell carcinoma cell line H226. The cells were incubated over different time periods with LTA and the proliferation was quantified on the one hand directly by direct cell counting (model: Casy® Cell Count) and on the other hand indirectly by measuring metabolic activity as well as DNA-synthesis by MTT- and BrdU-assay. Furthermore, cellular IL-8-synthesis after LTA-incubation was quantified by ELISA. The cell surface and signal molecules TLR2, TLR4 and IL-8 were selectively inhibited by the use of monoclonal antibodies and their effect on proliferation of A549 under the influence of LTA was quantified. Similarly IL-8-synthesis was measured under the influence of LTA and the inhibition of TLR2 and TLR4. LTA incubated in low test concentrations already produced a significant increase of proliferation and cell metabolism observed on A549 and H226. Also the activity of DNA-synthesis was tendentially stimulated by LTA. LTA induced a dose-dependent significantly increased IL-8-synthesis during the course of incubation. In addition the LTA-induced increase of cell proliferation was neutralized by TLR2-blocking antibodies as well as by IL-8-blocking antibodies. Also it was observed that the LTA-induced IL-8-increase was depending on TLR2.

The ligation of LTA to NSCLC cells could also be clinical relevant to the NSCLC progression in vivo. The pro-proliferative effect mediated by LTA is dependent on cellular stimulation of TLR2 and ligation of IL-8. Because of its own pro-proliferative effect IL-8 could stimulate the tumor growth by paracrine and autocrine pathways. Due to the pro-angiogenic effect of IL-8, LTA could stimulate tumor vascularization in vivo.

Thus comorbid patients who suffer from NSCLC and pneumonia could be affected by an accelerated tumor progression. The use of inhibitors against TLR2 and IL-8 could reduce the LTA-induced increase of tumor cell proliferation also in vivo.

7 Abkürzungsverzeichnis

adMSC:	adipose tissue-derived mesenchymal stem cells
AKT:	protein kinase B (serine/threonine protein kinase)
AP-1:	activator protein 1
AR:	androgen receptor
AZ:	Allgemeinzustand
Bax:	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2:	B-cell lymphoma 2
Bcl-x _L :	Bcl-2-like 1 longer isoform
Bcl-x _S :	Bcl-2-like 1 shorter isoform
BMDM:	bone marrow-derived macrophages
BrdU:	bromdesoxyuridine
C5a:	complement component 5a
CD:	cluster of differentiation
Cdc42 GTPase:	cell division control protein 42 GTPase
C/EBP:	CCAAT/enhancer-binding protein
clAP:	cellular inhibitor of apoptosis
CCL2	CC-chemokine-ligand-2
COX-2:	cyclooxygenase-2
CpG (ds-DNA):	cytosine phosphate guanine double-stranded DNA
CXCR:	CXC chemokine receptor
DAMPs:	danger-associated molecular patterns
DAPI:	4', 6-diamidin-2-phenylindol
DIC:	disseminated intravascular coagulation
DMEM:	dulbecco's modified eagle's medium
EGFR:	epidermal growth factor receptor
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
ELM4-ALK:	echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase
ER:	estrogen receptor
ERK:	extracellular-signal-regulated kinases
FCS:	fetal calf serum
FGFR:	fibroblast growth factor receptor
G-CSF:	granulocyte colony-stimulating factor
Glc-1-P:	glucose-1-phosphate
Glc-6-P:	glucose-6-phosphate

Abkürzungsverzeichnis

Glc2DAG:	diglucosyldiacylglycerol
GRO- α , - β , - γ :	growth-regulated oncogene - α , - β , - γ
Gro-P:	glycerophosphate
GtaB-UTB:	α -glucose-1-phosphate uridyl transferase
GTPase:	guanosine triphosphate hydrolyzing enzyme
HEK293:	human embryonic kidney cells
HGF:	hepatocyte growth factor
HIF-1:	hypoxia-inducible factor 1
ICAM-1:	intercellular adhesion molecule 1
IFN- α :	interferon-alpha
IFN- γ :	interferon-gamma
I κ B:	inhibitor of kappa B
IKK:	inhibitor of NF- κ B kinase
IL-6:	interleukin-6
IL-8:	interleukin-8
IRAK:	interleukin-receptor-associated kinase
IRF:	interferon regulatory factor
JAK2:	janus kinase 2
JNK:	c-Jun N-terminal kinases
LBP:	LPS-binding protein
LPS:	lipopolysaccharide
LRR:	leucine-rich repeat
LTA:	lipoteichoic acid
LtaA:	lipoteichoic acid protein A
LtaS:	lipoteichoic acid synthase
LTB ₄ :	leukotriene B ₄
MAL:	MyD88-adaptor-like
MALP-2:	makrophage-activating lipopeptide of 2 kDa
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
MAP3K:	mitogen-activated protein kinase 3
mCD14:	membrane-bound CD14
Mcl-1:	myeloid cell leukemia 1
MCP-1:	monocyte chemoattractant protein-1
MD-2:	myeloid differentiation factor-2
MMP:	matrix metalloproteinase
MTT:	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt

Abkürzungsverzeichnis

MyD88:	myloid differentiation primary response gene 88
NF-κB:	nuclear factor kappa-B
NLR:	nod-like receptor
NO:	nitric oxide
NOD:	nucleotide-binding oligomerization domain
NSCLC:	non-small cell lung cancer
PAF:	platelet activating factor
Pam ₃ CSK ₄ :	palmitoyl-3-cysteine-serine-lysine-4
PAMPs:	pathogen-associated molecular patterns
PARP:	Poly ADP ribose polymerase
PBMC:	peripheral blood mononuclear cell
PDTC:	pyrrolidine dithiocarbamate
PG:	phosphatidylglycerol
PGN:	peptidoglykan
PgcA:	particulate guanylyl cyclase A
PI3K:	phosphatidylinositide 3-kinase
PLC:	phospholipase C
PMN:	polymorphonuclear cells
Poly I:C:	polyinosinic:polycytidylic acid
PPG:	peptidoglycan
PRR:	pattern-recognition receptor
RacGTPase:	Subgruppe der Rho-Familie von GTPasen
RasGTP:	rat sarcoma guanosintriphosphate
RhoGTPase:	ras homologue GTPase
RIP:	receptor interacting protein
ROS:	reactive oxygen species
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
SCID:	severe-combined-immunodeficiency
SCLC:	small cell lung cancer
SIRS:	systemic inflammatory response syndrome
STAT3:	signal transducers and activators of transcription 3
TAK1:	TGF-beta activated kinase 1
TAN:	tumor-associated neutrophil
TAM:	tumor-associated macrophage
TBK1:	TANK-binding kinase 1
TIR:	toll-interleukin-1-receptor domain
TLR:	toll-like receptor

Abkürzungsverzeichnis

TNF- α :	tumor necrosis factor alpha
TRAF6:	TNF receptor-associated factor 6
TRAM:	TRIF-related adaptor molecule
TREM-1:	triggering receptor expressed on myeloid cells 1
TRIF:	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
UDP-Glc:	uridine diphosphate glucose
VEGF:	vascular endothelial growth factor
XTT:	(2, 3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel von LTA Typ I (Staphylococcus aureus).	7
Abb. 2: Rolle der LTA in der Pathophysiologie von Entzündung, Gewebeschaden und postinfektiösen Spätkomplikationen..	9
Abb. 3: Liganden der TLR und Signaltransduktion im Überblick.	12
Abb. 4: Lichtmikroskopische Aufnahme von H226 in Kultur, Vergrößerung 10 x.	19
Abb. 5: Prinzip eines Sandwich-ELISAs.	28
Abb. 6: Proliferation unter Inkubation mit LTA. Messung durch Casy® Cell Count.	33
Abb. 7: Zellstoffwechselaktivität unter Inkubation mit LTA. Messung durch MTT-Assay.	35
Abb. 8: Aktivität der DNA-Synthese von A549 unter Inkubation mit LTA. Messung durch BrdU-Assay.	36
Abb. 9: IL-8-Synthese unter Inkubation mit LTA. Messung durch ELISA.	37
Abb. 10: Proliferation von A549 unter Inkubation von 0,1 µg/ml LTA sowie Blockade von TLR2, TLR4 und IL-8. Messung durch Casy® Cell Count.	39
Abb. 11: Proliferation von A549 unter Inkubation von 1 µg/ml LTA sowie Blockade von TLR2, TLR4 und IL-8. Messung durch Casy® Cell Count.	41
Abb. 12: Zelluläre IL-8-Synthese unter Inkubation von A549 mit LTA sowie Blockade von TLR2 und TLR4. Messung durch ELISA.	42
Abb. 13: Stimulation von A549-Zellen mit LTA bewirkt Anstieg von Proliferation, Zellstoffwechsel und IL-8-Synthese.	49
Abb. 14: Interaktion von A549 mit LTA. Freisetzung von IL-8 und autokrine Stimulation von A549 durch Bindung von IL-8 an EGFR sowie an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR1.	54
Abb. 15: Effekt von LTA und IL-8 auf A549-Zellen. Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB, STAT3 und AP-1 und Produktionsanstieg anti-apoptotischer Genprodukte wie z.B. Bcl-2, Mcl-1, c-Jun und MMP2/9. Vergrößerung des Quotienten aus anti-apoptotischen zu pro-apoptotischen Genproduktion (z.B. Bax).	56

9 Literaturverzeichnis

Adrian, E. D. (1914): The All-or-none principle in nerve. In: *The Journal of Physiology* 47, S. 460–474.

Alberg, A. J.; Brock, M. V.; Ford, J. G.; Samet, J. M.; Spivack, S. D. (2013): Epidemiology of Lung Cancer. Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. In: *Chest* 143 (5), S. e1S-e29S.

Ando, K.; Takahashi, F.; Motojima, S.; Nakashima, K.; Kaneko, N.; Takahashi, K. (2013): Possible Role for Tocilizumab, an Anti–Interleukin-6 Receptor Antibody, in Treating Cancer Cachexia. In: *Journal of clinical oncology* 31 (6).

Andreas, S.; Rittmeyer, A.; Hinterthaler, M.; Huber, R. M. (2013): Smoking Cessation in Lung Cancer—Achievable and Effective. In: *Deutsches Ärzteblatt International* 110 (43), S. 719–724.

Aoki, Y.; Feldman, G. M.; Tosato, G. (2003): Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. In: *Blood* 101 (4), S. 1535–1542.

Arenberg, D. A.; Kunkel, S. L.; Poverini, P. J.; Glass, M.; Burdick, M. D.; Strieter, R. M. (1996): Inhibition of Interleukin-8 Reduces Tumorigenesis of Human Non-Small Cell Lung Cancer in SCID Mice. In: *J. Clin. Invest.* (97), S. 2792–2802.

Armbrecht, M. (2011): Erstellung einer Standardkurve f. r einen kolorimetrischen Assay am Eppendorf BioSpectrometer® basic und Eppendorf BioSpectrometer® kinetic. Userguide.

Atsumi, T.; Singh, R.; Sabharwal, L.; Bando, H.; Meng, J.; Arima, Y. et al. (2014): Inflammation Amplifier, a New Paradigm in Cancer Biology. In: *Cancer Research* 74 (1), S. 8–14.

Aulock, S. von; Morath, S.; Hareng, L.; Knapp, S.; van Kessel, K. P. M.; van Strijp, J. A. G. (2003): Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus for neutrophil recruitment. In: *Immunobiology* 208 (4), S. 413–422.

Baggiolini, M.; Walz, A.; Kunkel, S. L. (1989): Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. In: *J. Clin. Invest.* 84 (4), S. 1045–1049.

Balcer-Kubiczek, E. K.; Attarpour, M.; Edelman, M. J. (2007): The synergistic effect of dimethylamino benzoylphenylurea (NSC #639829) and X-irradiation on human lung carcinoma cell lines. In: *Cancer Chemother Pharmacol* 59 (6), S. 781–787.

- Bang, B. R.; Kim, S. J.; Yagita, H.; Croft, M.; Kang, Y. J. (2015): Inhibition of 4-1BBL-regulated TLR response in macrophages ameliorates endotoxin-induced sepsis in mice. In: *Eur. J. Immunol.* 45 (3), S. 886–892.
- Baroni, A.; Perfetto, B.; Ruocco, E.; Rossano, F. (1998): Lipoteichoic acid and protein-A from stimulate release of hepatocyte growth factor (HGF) by human dermal fibroblasts. In: *Archives of Dermatological Research* 290, S. 211–214.
- Barton, G. M.; Kagan, J. C. (2009): A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. In: *Nat Rev Immunol* 9 (8), S. 535–542.
- Bates, D.; Maechler, M.; Bolker, B.; Walker, S. (2014): Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.1-7.
- Baumann, C. L.; Aspalter, I. M.; Sharif, O.; Pichlmair, A.; Bluml, S.; Grebien, F. et al. (2010): CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9. In: *Journal of Experimental Medicine* 207 (12), S. 2689–2701.
- Belda, J.; Cavalcanti, M.; Ferrer, M.; Serra, M.; de la Bellacasa, J. P.; Canalis, E.; Torres, A. (2005): Bronchial Colonization and Postoperative Respiratory Infections in Patients Undergoing Lung Cancer Surgery. In: *Chest* 128 (3), S. 1571–1579.
- Berghmans, T.; Sculier, J.-P.; Klastersky, J. (2003): A Prospective Study of Infections in Lung Cancer Patients Admitted to the Hospital. In: *Chest* 124, S. 114–120.
- Berglind, H.; Pawitan, Y.; Kato, S.; Ishiaka, C.; Soussi, T. (2008): Analysis of p53 mutation status in human cancer cell lines. A paradigm for cell line cross-contamination. In: *Cancer Biology & Therapy* 7 (5), S. 701–710.
- Berridge, M. V.; Herst, P. M.; Tan, A. S. (2005): Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction 11, S. 127–152.
- Biarç, J.; Nguyen, I. S.; Pini, A.; Gossé, F.; Richert, S.; Thiersé, D. et. al. (2004): Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S.bovis*). In: *Carcinogenesis* 25 (8), S. 1477–1484.
- Bio-Tek Instruments, Inc. (2005): ELx808™ Absorbance Microplate Reader. Operator's Manual.
- Bishayi, B.; Bandyopadhyay, D.; Majhi, A.; Adhikary, R. (2014): Expression of CXCR1 (Interleukin-8 Receptor) in Murine Macrophages After *Staphylococcus aureus* Infection and its Possible Implication on Intracellular Survival Correlating with Cytokines and Bacterial Anti-Oxidant Enzymes. In: *Inflammation*.

- Bleharski, J. R.; Kiessler, V.; Buonsanti, C.; Sieling, P. A.; Stenger, S.; Colonna, M.; Modlin, R. L. (2003): A Role for Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 in Host Defense During the Early-Induced and Adaptive Phases of the Immune Response. In: *The Journal of Immunology* 170 (7), S. 3812–3818.
- Boucher, H. W.; Corey, G. R. (2008): Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Clinical Infectious Diseases* 46 (Suppl 5), S. 344–S349.
- Bouchon, A.; Facchetti, F.; Weigand, M. A.; Colonna, M. (2001): TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. In: *Nature* 410, S. 1103–1107.
- Brandt, K. J.; Fickentscher, C.; Kruithof, E. K. O.; Moerlose, P. de (2013): TLR2 Ligands Induce NF- κ B Activation from Endosomal Compartments of Human Monocytes. In: *PLOS ONE* 8 (12), S. 1–11.
- Brat, D. J.; Bellail, A. C.; Van Meir, E. G. (2005): The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. In: *Neuro-Oncology* 7, S. 122–133.
- Brown, K.; Gerstberger, S.; Carlson, L.; Franzoso, G.; Siebenlist, U. (1995): Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. In: *Science* 267 (5203), S. 1485–1488.
- Bruder, J. T.; Kovesdi, I. (1997): Adenovirus Infection Stimulates the Raf/MAPK Signaling Pathway and Induces Interleukin-8 Expression. In: *Journal of Virology* 71 (1), S. 398–404.
- Bröske-Hohlfeld, I. (2009): Environmental and Occupational Risk Factors for Lung Cancer. In: *Methods in Molecular Biology* 472, S. 3–23.
- Bunk, S.; Sigel, S.; Metzdorf, D.; Sharif, O.; Triantafilou, K.; Triantafilou, M. et al. (2010): Internalization and Coreceptor Expression Are Critical for TLR2-Mediated Recognition of Lipoteichoic Acid in Human Peripheral Blood. In: *The Journal of Immunology* 185 (6), S. 3708–3717.
- Bunn Jr, P. A. (2012): Worldwide Overview of the Current Status of Lung Cancer Diagnosis and Treatment. Lung Cancer Advances in Prevention, Early Detection, and Therapy,. In: *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 136, S. 1478–1481.
- Caiazza, N. C.; O'Toole, G. A. (2003): Alpha-Toxin Is Required for Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of Bacteriology* 185 (10), S. 3214–3217.
- Catlett-Falcone, R.; Landowski, T. H.; Oshiro, M. M.; Turkson, J.; Levitzki, A.; Savino, R. et al. (1999): Constitutive Activation of Stat3 Signaling Confers Resistance to Apoptosis in Human U266 Myeloma Cells. In: *Immunity* 10, S. 105–115.

- Chang, M. M.-J.; Juarez. M.; Hyde, D. M.; Wu, R. (2001): Mechanism of dexamethasone-mediated interleukin-8 gene suppression in cultured airway epithelial cells. In: *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 280 (1), S. L107–L115.
- Charles, P.-E.; Tissières, P.; Barbar, S.; Croisier, D.; Dufour, J.; Dunn-Siegrist, I. et al. (2011): Mild-stretch mechanical ventilation upregulates toll-like receptor 2 and sensitizes the lung to bacterial lipopeptide. In: *Crit Care* 15 (4), S. R181.
- Chia, W. K.; Ali, R.; Toh, H. C. (2012): Aspirin as adjuvant therapy for colorectal cancer—reinterpreting paradigms. In: *Nature Reviews Clinical Oncology* 9 (10), S. 561–570.
- Chiba, T.; Marusawa, H.; Seno, H.; Watanabe, N. (2008): Mechanism for gastric cancer development by *Helicobacter pylori* infection. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23, S. 1175–1181.
- Chin, A. C.; Parkos, C. A. (2007): Pathobiology of Neutrophil Transepithelial Migration: Implications in Mediating Epithelial Injury. In: *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2, S. 111–143.
- Cho, M.-L.; Ju, J.-H.; Kim, H.-R.; Oh, H.-J.; Kang, C.-M.; Jhun, J.-Y. et al. (2007): Toll-like receptor 2 ligand mediates the upregulation of angiogenic factor, vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 in human rheumatoid synovial fibroblasts. In: *Immunology Letters* 108, S. 121–128.
- Chow, S. C.; Gowing, S. D.; Cools-Lartigue, J. J.; Chen, C. B.; Berube, J.; Yoon, H.-W. et al. (2014): Gram negative bacteria increase non-small cell lung cancer metastasis via toll-like receptor 4 activation and mitogen-activated protein kinase phosphorylation. In: *International Journal of Cancer*.
- Chung, F.-T.; Lee, K.-Y.; Wang, C.-W.; Heh, C.-C.; Chan, Y.-F.; Chen, H.-W. et al. (2012): Tumor-associated macrophages correlate with response to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. In: *International Journal of Cancer* 131 (3), S. E227–E235.
- Chuntharapai, A.; Kim, K. J. (1995): Regulation of the Expression of IL-8 Receptor A/B by IL-8: Possible Functions of Each Receptor. In: *Journal of Immunology* (155), S. 2587–2594.
- Collins, A. J.; Foley, R. N.; Chavers, B.; Gilbertson, D.; Herzog, C.; Johansen, K. et al. (2012): US Renal Data System 2011 Annual Data Report. In: *American Journal of Kidney Diseases* 59 (1), S. A7.

- Colotta, F.; Allavena, P.; Sica, A.; Garlanda, C.; Mantovani, A. (2009): Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. In: *Carcinogenesis* 30 (7), S. 1073–1081.
- Correa, P.; Houghton, J. (2007): Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. In: *Gastroenterology* 133 (2), S. 659–672.
- Cory, A. H.; Owen, T. C.; Barltrop, J. A.; Cory, J. G. (1991): Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. In: *Cancer Commun.* 3 (7), S. 207–212.
- da Cunha Santos, G.; Shepherd, F. A.; Tsao, M. S. (2011): EGFR Mutations and Lung Cancer. In: *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6 (1), S. 49–69.
- de la Horra, C.; Varela, J. M.; Fernández-Alonso, J.; Medrano, F. J.; Respaldiza, N.; Montes-Cano, M. A.; Calderón, E. J. (2004): Association between human-Pneumocystis infection and small-cell lung carcinoma. In: *European Journal of Clinical Investigation* 34 (3), S. 229–235.
- Devesa, S. S.; Bray, F.; Vizcaino, A. P.; Parkin, D. M. (2005): International lung cancer trends by histologic type: Male:Female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. In: *International Journal of Cancer* 117, S. 294–299.
- Diakos, C. I.; Charles, K. A.; McMillan, D. C.; Clarke, S. J. (2014): Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. In: *The Lancet Oncology* 15 (11), S. e493–e503.
- Dieci, M. V.; Arnedos, M.; Andre, F.; Soria, J. C. (2013): Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitors as a Cancer Treatment: From a Biologic Rationale to Medical Perspectives. In: *Cancer Discovery* 3 (3), S. 264–279.
- DiMango, E.; Zar, H. J.; Bryan, R.; Prince, A. (1995): Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. In: *Journal of Clinical Investigation* 96 (5), S. 2204–2210.
- Dinges, M. M.; Orwin, P. M.; Schlievert, P. M. (2000): Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. In: *Clinical Microbiology Reviews* 13 (1), S. 16–34.
- Droemann, D.; Goldmann, T.; Tiedje, T.; Zabel, P.; Dalhoff, K.; Schaaf, B. (2005): Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. In: *Respiratory Research* 6 (1), S. 68.

- Elliott, C. L.; Allport, V. C.; Loudon, J. A. Z.; Wu, G. D.; Bennett, P. R. (2001): Nuclear factor-kappa B is essential for up-regulation of interleukin-8 expression in human amnion and cervical epithelial cells. In: *Molecular Human Reproduction* 7 (8), S. 787–790.
- Epling-Burnette, P. K.; Liu, J. H.; Catlett-Falcone, R.; Turkson, J.; Oshiro, M.; Kothapalli, R. et al. (2001): Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. In: *Journal of Clinical Investigation* 107 (3), S. 351–362.
- Fagard, R.; Metelev, V.; Souissi, I.; Baran-Marszak, F. (2014): STAT3 inhibitors for cancer therapy. In: *JAK-STAT* 2 (1), S. e22882-1 - e22882-2.
- Faurschou, M.; Borregaard, N. (2003): Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. In: *Microbes and Infection* 5 (14), S. 1317–1327.
- Fiedler, T.; Salamon, A.; Adam, S.; Herzmann, N.; Taubenheim, J.; Peters, K. (2013): Impact of bacteria and bacterial components on osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. In: *Experimental Cell Research* 319 (18), S. 2883–2892.
- Finberg, R. W.; Kurt-Jones, E. A. (2006): CD14: Chaperone or Matchmaker? In: *Immunity* 24 (2), S. 127–129.
- Fort, M. M.; Mozaffarian, A.; Stöver, A. G.; Correia, J. d. S.; Johnson, D. A.; Crane, R. T. et al. (2005): A Synthetic TLR4 Antagonist Has Anti-Inflammatory Effects in Two Murine Models of Inflammatory Bowel Disease. In: *The Journal of Immunology* 174, S. 6416–6423.
- Frantz, S.; Ertl, G.; Bauersachs, J. (2007): Mechanisms of Disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. In: *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 4 (8), S. 444–454.
- Fu, K.; Sun, X.; Zheng, W.; Wier, E. M.; Hodgson, A.; Tran, D. Q. et al. (2013): Sam68 modulates the promoter specificity of NF- κ B and mediates expression of CD25 in activated T cells. In: *Nature Communications* 4 (1909), S. 1–23.
- Fukata, M.; Vamadevan, A. S.; Abreu, M. T. (2009): Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. In: *Seminars in Immunology* 21 (4), S. 242–253.
- Gan, S. D.; Patel, K. R. (2013): Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: *Journal of Investigative Dermatology* 133 (e12), S. 1–3.

- Gao, J. J.; Xue, Q.; Zuvanichi, E. G.; Haghi, K. R.; Morrison, D. C. (2001): Commercial Preparations of Lipoteichoic Acid Contain Endotoxin That Contributes to Activation of Mouse Macrophages In Vitro. In: *Infection and Immunity* 69 (2), S. 751–757.
- Garofalo, R.; Sabry, M.; Jamaluddin, M.; Yu, R. K.; Casola, A.; Ogra, P. L.; Brasier, A. R. (1996): Transcriptional Activation of the Interleukin-8 Gene by Respiratory Syncytial Virus Infection in Alveolar Epithelial Cells: Nuclear Translocation of the RelA Transcription Factor as a Mechanism Producing Airway Mucosal Inflammation. In: *Journal of Virology* 70 (12), S. 8773–8781.
- Germano, G.; Mantovani, A.; Allavena, P. (2011): Targeting of the innate immunity/inflammation as complementary anti-tumor therapies. In: *Annals of Medicine* 43 (8), S. 581–593.
- Ginsburg, I. (2002): Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. In: *The Lancet Infectious Diseases* 2 (3), S. 171–179.
- Gisch, N.; Kohler, T.; Ulmer, A. J.; Muthing, J.; Pribyl, T.; Fischer, K. et al. (2013): Structural Reevaluation of Streptococcus pneumoniae Lipoteichoic Acid and New Insights into Its Immunostimulatory Potency. In: *Journal of Biological Chemistry* 288 (22), S. 15654–15667.
- Glauner, B. (2006): Stromausschlussverfahren. Standardisierung der Vitalitätsbestimmung. In: *Biospektrum* 12, S. 394–395.
- Goeckenjan, G.; Sitter, H.; Thomas, M.; Branscheid, D.; Flentje, M.; Griesinger, F. et al. (2010): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms: Georg Thieme Verlag KG (64). In: *Pneumologie* (Supplement 2), S. e1-e164.
- Govindan, R.; Page, N.; Morgensztern, D.; Read, W.; Tierney, R.; Vlahiotis, A. et al. (2006): Changing Epidemiology of Small-Cell Lung Cancer in the United States Over the Last 30 Years: Analysis of the Surveillance, Epidemiologic, and End Results Database. In: *Journal of clinical oncology* 24 (28), S. 4539–4544.
- Grandel, U.; Heygster, D.; Sibelius, U.; Fink, L.; Sigel, S.; Seeger, W. et al. (2009): Amplification of Lipopolysaccharide-Induced Cytokine Synthesis in Non-Small Cell Lung Cancer/Neutrophil Cocultures. In: *Molecular Cancer Research* 7 (10), S. 1729–1735.
- Grange, R. D.; Thompson, J. P.; Lambert, D. G. (2014): Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. In: *British Journal of Anaesthesia* 112 (2), S. 213–216.

- Gras, D.; Tiers, L.; Vachier, I.; de Senneville, L. D.; Bourdin, A.; Godard, P. et al. (2010): Regulation of CXCR/IL-8 in Human Airway Epithelial Cells. In: *International Archives of Allergy and Immunology* 152 (2), S. 140–150.
- Groeger, A. M.; Esposito, V.; Luca, A. de; Cassandro, R.; Tonini, G.; Ambrogi, V. et al. (2004): Prognostic value of immunohistochemical expression of p53, bax, Bcl-2 and Bcl-xL in resected non-small-cell lung cancers. In: *Histopathology* 44, S. 54–63.
- Groner, B.; Lucks, P.; Borghouts, C. (2008): The function of Stat3 in tumor cells and their microenvironment. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19 (4), S. 341–350.
- Grossi, F.; Tiseo, M. (2006): Granulocyte growth factors in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). In: *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 58 (3), S. 221–230.
- Grundling, A.; Schneewind, O. (2007): Genes Required for Glycolipid Synthesis and Lipoteichoic Acid Anchoring in *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of Bacteriology* 189 (6), S. 2521–2530.
- Han, S. H.; Kim, J. H.; Martin, M.; Michalek, S. M.; Nahm, M. H. (2003): Pneumococcal Lipoteichoic Acid (LTA) Is Not as Potent as Staphylococcal LTA in Stimulating Toll-Like Receptor 2. In: *Infection and Immunity* 71 (10), S. 5541–5548.
- Hashimoto, M.; Furuyashiki, M.; Kaseya, R.; Fukada, Y.; Akimaru, M.; Aoyama, K. et al. (2007): Evidence of Immunostimulating Lipoprotein Existing in the Natural Lipoteichoic Acid Fraction. In: *Infection and Immunity* 75 (4), S. 1926–1932.
- Hattar, K.; Grandel, U.; Moeller, A.; Fink, L.; Iglhaut, J.; Hartung, T. et al. (2006): Lipoteichoic acid (LTA) from *Staphylococcus aureus* stimulates human neutrophil cytokine release by a CD14-dependent, Toll-like-receptor-independent mechanism: Autocrine role of tumor necrosis factor-[alpha] in mediating LTA-induced interleukin-8 generation. In: *Critical Care Medicine* 34 (3), S. 835–841.
- Hattar, K.; Savai, R.; Subtil, F. S. B.; Wilhelm, J.; Schmall, A.; Lang, D. S. et al. (2013): Endotoxin induces proliferation of NSCLC in vitro and in vivo: role of COX-2 and EGFR activation. In: *Cancer Immunology, Immunotherapy* 62 (2), S. 309–320.
- Haura, E. B.; Zheng, Z.; Song, L. et. al. (2005): Activated Epidermal Growth Factor Receptor-Stat-3 Signaling Promotes Tumor Survival In vivo in Non-Small Cell Lung Cancer. In: *Clinical Cancer Research* 11 (23), S. 8288–8294.
- Heinrich, P. C.; Löffler, G. (2014): Biochemie und Pathobiochemie. 9. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).

- Hirsch, F. R.; Varella-Garcia, M.; Bunn Jr, P. A.; Di Maria, M. V.; Veve, R.; Bremnes, R. M. (2003): Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small-Cell Lung Carcinomas: Correlation Between Gene Copy Number and Protein Expression and Impact on Prognosis. In: *Journal of clinical oncology* 21 (20), S. 3798–3807.
- Ho, C.-C.; Liao, W.-Y.; Wang, C.-Y.; Lu, Y.-H.; Huang, H.-Y.; Chen, H.-Y. et al. (2008): TREM-1 Expression in Tumor-associated Macrophages and Clinical Outcome in Lung Cancer. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177 (7), S. 763–770.
- Hoebe, K.; Georgel, P.; Rutschmann, S.; Du, X.; Mudd, S.; Crozat, K. et al. (2005): CD36 is a sensor of diacylglycerides. In: *Nature* 433, S. 523–527.
- Hoffmann, D.; Hoffmann, I.; El-Bayoumy, K. (2001): The Less Harmful Cigarette: A Controversial Issue. A Tribute to Ernst L. Wynder. In: *Chemical Research in Toxicology* 14 (7), S. 767–790.
- Hoffmann, E.; Dittrich-Breiholz, O.; Holtmann, H.; Kracht, M. (2002): Multiple control of interleukin-8 gene expression. In: *Journal of Leukocyte Biology* 72, S. 847–855.
- Holmes, W. E.; Lee, J.; Kuang, W.; Rice, G.; Wood, W. (1991): Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. In: *Science* 253 (5025), S. 1278–1280.
- Hoogerwerf, J. J.; de Vos, A. F.; Bresser, P.; van der Zee, J. S.; Pater, J. M.; de Boer, A. et al. (2008): Lung Inflammation Induced by Lipoteichoic Acid or Lipopolysaccharide in Humans. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178 (1), S. 34–41.
- Horlock, C.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hg. v. British Society for Immunology. Imperial College London, UK. Online verfügbar unter <http://bitesized.immunology.org/experimental-techniques/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/>.
- Huang, B.; Zhao, J.; Shen, S.; Li, H.; He, K.-L.; Shen, G.-X. et al. (2007): *Listeria monocytogenes* Promotes Tumor Growth via Tumor Cell Toll-Like Receptor 2 Signaling. In: *Cancer Research* 67 (9), S. 4346–4352.
- Huang, Q.; Du, J.; Fan, J.; Lv, Z.; Qian, X.; Zhang, X. et al. (2014): The effect of proinflammatory cytokines on IL-17RA expression in NSCLC. In: *Medical Oncology* 31 (9).
- Huang, S.; Mills, L.; Mian, B.; Tellez, C.; McCarty, M.; Yang, X.-D. et al. (2002): Fully Humanized Neutralizing Antibodies to Interleukin-8 (ABX-IL8) Inhibit Angiogenesis,

- Tumor Growth, and Metastasis of Human Melanoma. In: *The American Journal of Pathology* 161 (1), S. 125–134.
- Hussain, S. P.; Harris, C. C. (2007): Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. In: *International Journal of Cancer* 121 (11), S. 2373–2380.
- Hussain, S. P.; Hofseth, L. J.; Harris, C. C. (2003): Radical causes of cancer. In: *Nature Reviews Cancer* 3 (4), S. 276–285.
- Itho, Y.; Joh, T.; Tanida, S.; Sasaki, M.; Katoaka, H.; Itoh, K. et al. (2005): IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. In: *Cytokine* 29, S. 275–282.
- Itzkowitz, S. H.; Yio, X. (2004): Inflammation and Cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. In: *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 287 (1), S. G7-G17.
- Iyer, S.; Roughley, A.; Rider, A.; Taylor-Stokes, G. (2014): The symptom burden of non-small cell lung cancer in the USA: a real-world cross-sectional study. In: *Supportive Care in Cancer* 22 (1), S. 181–187.
- Janku, F.; Stewart, D. J.; Kurzrock, R. (2011): Targeted therapy in non-small-cell lung cancer—is it becoming a reality? In: *Nat Rev Clin Oncol* 8 (7), S. 384.
- Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. (2011): Global cancer statistics. In: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61 (2), S. 69–90.
- Jemal, A.; Center, M. M.; DeSantis, C.; Ward, E. M. (2010): Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. In: *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 19 (8), S. 1893–1907.
- Ji, H.; Houghton, A. M.; Mariani, T. J.; Perera, S.; Kim, C. B.; Padera, R. et al. (2006): K-ras activation generates an inflammatory response in lung tumors. In: *Oncogene* 25, S. 2105–2112.
- Jiang, Z.; Georgel, P.; Du, X.; Shamel, L.; Sovath, S.; Mudd, S. et al. (2005): CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. In: *Nature Immunology* 6 (6), S. 565–570.
- Johnson, L.; Mercer, K.; Greenbaum, D.; Bronsonk, R. T.; Crowley, D.; Tuveson, D. A.; Jacks, T. (2001): Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. In: *Nature* 410, S. 1111–1116.

- Kagan, J. C.; Su, T.; Horng, T.; Chow, A.; Akira, S.; Medzhitov, R. (2008): TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . In: *Nature Immunology* 9 (4), S. 361–368.
- Kallen, A. J.; Brunkard, J.; Moore, Z.; Budge, P.; Arnold, K. E.; Fosheim, G. et al. (2009): Staphylococcus aureus Community-Acquired Pneumonia During the 2006 to 2007 Influenza Season. In: *Annals of Emergency Medicine* 53 (3), S. 358–365.
- Karashima, T.; Sweeney, P.; Kamat, A.; Huang, S.; Kim, S. J.; Bar-Eli, M. (2003): Nuclear Factor- κ B Mediates Angiogenesis and Metastasis of Human Bladder Cancer through the Regulation of Interleukin-8. In: *Clinical Cancer Research* (9), S. 2786–2797.
- Kasuga, I.; Makino, S.; Kiyokawa, H.; Katoh, H.; Ebihara, Y.; Ohyashiki, K. (2001): Tumor-related leukocytosis is linked with poor prognosis in patients with lung carcinoma. In: *Cancer* 92 (9), S. 2399–2405.
- Kataki, A.; Scheid, P.; Piet, M.; Marie, B.; Martinet, N.; Martinet, Y.; Vignaud, J.-M. (2002): Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression. In: *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 140 (5), S. 320–328.
- Kato, T.; Yoshioka, H.; Okamoto, I.; Yokoyama, A.; Hida, T.; Seto, T. et al. (2015): Afatinib versus cisplatin plus pemetrexed in Japanese patients with advanced non-small cell lung cancer harboring activating EGFR mutations: Subgroup analysis of LUX-Lung 3. In: *Cancer Sci* 106 (9), S. 1202–1211.
- Kawai, T.; Akira, S. (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. In: *Nature Immunology* 11 (5), S. 373–384.
- Kelley, S. L.; Lukk, T.; Nair, S. K.; Tapping, R. I. (2013): The Crystal Structure of Human Soluble CD14 Reveals a Bent Solenoid with a Hydrophobic Amino-Terminal Pocket. In: *The Journal of Immunology* 190 (3), S. 1304–1311.
- Kent, A.; Blander, J. M. (2014): Nod-Like Receptors: Key Molecular Switches in the Conundrum of Cancer. In: *Frontiers in Immunology* 5 (185), S. 1–5.
- Khan, M, N.; Wang, B.; Wei, J.; Zhang, Y.; Li, Q.; Luan, X. et al. (2015): CXCR1/2 antagonism with CXCL8/Interleukin-8 analogue CXCL8(3–72)K11R/G31P restricts lung cancer growth by inhibiting tumor cell proliferation and suppressing angiogenesis. In: *Oncotarget*, zuletzt geprüft am 19.07.2015.
- Kim, S. M.; Yun, M. R.; Hong, Y. K.; Solca, F.; Kim, J.-H.; Kim, H.-J.; Cho, B. C. (2013): Glycolysis Inhibition Sensitizes Non-Small Cell Lung Cancer with T790M Mutation to

Irreversible EGFR Inhibitors via Translational Suppression of Mcl-1 by AMPK Activation. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 12 (10), S. 2145–2156.

Kluwe, J.; Mencin, A.; Schwabe, R. F. (2009): Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis. In: *Journal of Molecular Medicine* 87 (2), S. 125–138.

Kundo, J. K.; Surh, Y.-J. (2008): Inflammation: Gearing the journey to cancer. In: *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 659 (1-2), S. 15–30.

Kurie, J. M.; Shin, H. J. C.; Lee, J. S.; Morice, R. C.; Ro, J. Y., Lippman, S. M. (1996): Increased epidermal growth factor receptor expression in metaplastic bronchial epithelium. In: *Clinical Cancer Research* (2), S. 1787–1793.

Kuznetsova, A.; Brockhoff, P. B.; Christensen, R. H. B. (2014): lmerTest: Tests in Linear Mixed Effects Models. R package version 2.0-20.

Landi, M. T.; Chatterjee, N.; Yu, K.; Goldin, L. R.; Goldstein, A. M.; Rotunno, M. et al. (2009): A Genome-wide Association Study of Lung Cancer Identifies a Region of Chromosome 5p15 Associated with Risk for Adenocarcinoma. In: *The American Journal of Human Genetics* 85 (5), S. 679–691.

Larsen, C. G.; Anderson, A. O.; Oppenheim, J. J.; Matsushima, K. (1989): Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. In: *Immunology* (68), S. 31–36.

Latz, E.; Visintin, A.; Lien, E.; Fitzgerald, K. A.; Monks, B. G.; Kurt-Jones, E. A. et al. (2002): Lipopolysaccharide Rapidly Traffics to and from the Golgi Apparatus with the Toll-like Receptor 4-MD-2-CD14 Complex in a Process That Is Distinct from the Initiation of Signal Transduction. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (49), S. 47834–47843.

Lee, H.-K.; Dunzendorfer, S.; Soldau, K.; Tobias, P. S. (2006): Double-Stranded RNA-Mediated TLR3 Activation Is Enhanced by CD14. In: *Immunity* 24 (2), S. 153–163.

Lee, I.; Lee, C.-W.; Tung, W.-H.; Wang, S.-W.; Lin, C.-C.; Shu, J.-C.; Yang, C.-M. (2010): Cooperation of TLR2 with MyD88, PI3K, and Rac1 in Lipoteichoic Acid-Induced cPLA2/COX-2-Dependent Airway Inflammatory Responses. In: *The American Journal of Pathology* 176 (4), S. 1671–1684.

Leemans, J. C.; Vervoordeldonk, M. J. B. M.; Florquin, S.; van Kessel, K. P.; van der Poll, T. (2002): Differential Role of Interleukin-6 in Lung Inflammation Induced by Lipoteichoic Acid and Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165 (10), S. 1445–1450.

- Lehman, T. A.; Bennett, W. P.; Metcalf, R. A.; Welsh, J. A.; Ecker, J.; Modali, R. V. et al. (1991): p53 Mutations, ras Mutations, and p53-Heat Shock 70 p53 Mutations, ras Mutations, and p53-Heat Shock Protein Complexes in Human Lung Carcinoma Cell Lines. In: *Cancer Research* 51, S. 4090–4096, zuletzt geprüft am 19.09.2015.
- Li, A.; Dubey, S.; Varney, M. L.; Dave, B. J.; Singh, R. K. (2003): IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis. In: *The Journal of Immunology* 170 (6), S. 3369–3376.
- Li, Z.; Wang, Y.; Dong, S.; Ge, C.; Xiao, Y.; Li, R. et al. (2014): Association of CXCR1 and 2 expressions with gastric cancer metastasis in ex vivo and tumor cell invasion in vitro. In: *Cytokine* 69 (1), S. 6–13.
- Liljeroos, M.; Vuolteenaho, R.; Morath, S.; Hartung, T.; Hallman, M.; Ojaniemi, M. (2007): Bruton's tyrosine kinase together with PI 3-kinase are part of Toll-like receptor 2 multiprotein complex and mediate LTA induced Toll-like receptor 2 responses in macrophages. In: *Cellular Signalling* 19 (3), S. 625–633.
- Liljeroos, M.; Vuolteenaho, R.; Rounioja, S.; Henriques-Normark, B.; Hallman, M.; Ojaniemi, M. (2008): Bacterial ligand of TLR2 signals Stat activation via induction of IRF1/2 and interferon- α production. In: *Cellular Signalling* 20 (10), S. 1873–1881.
- Lin, A.; Karin, M. (2003): NF- κ B in cancer: a marked target. In: *Seminars in Cancer Biology* 13 (2), S. 107–114.
- Lindeman, N. I.; Cagle, P. T.; Beasley, M. B.; Chitale, D. A.; Dacic, S.; Giaccone, G. et al. (2013): Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors. In: *The Journal of Molecular Diagnostics* 15 (4), S. 415–453.
- Littman, A. J.; Jackson, L. A.; Vaughan, T. L. (2005): Chlamydia pneumoniae and Lung Cancer: Epidemiologic Evidence. In: *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 14 (4), S. 773–778.
- Lotz, S.; Starke, A.; Ziemann, C.; Morath, S.; Hartung, T.; Solbach, W., Laskay, T. (2006): β -lactam antibiotic-induced release of lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus leads to activation of neutrophil granulocytes. In: *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 5 (15).
- Lu, X.; Errington, J.; Curtin, N. J.; Lunec, J.; Newell, D. R. (2001): The Impact of p53 Status on Cellular Sensitivity to Antifolate Drugs. In: *Clinical Cancer Research* 7, S. 2114–2123, zuletzt geprüft am 17.09.2015.

- Luo, J.-L.; Maeda, S.; Hsu, L.-C.; Yagita, H.; Karin, M. (2004): Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF α to TRAIL-mediated tumor regression. In: *Cancer Cell* 6 (3), S. 297–305.
- Luppi, F.; Longo, A. M.; Boer, W. I. de; Rabe, K. F.; Hiemstra, P. S. (2007): Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. In: *Lung Cancer* 56 (1), S. 25–33.
- Malla, N.; Khurana, S.; Dubey, M. L. (2005): Association of Parasitic Infections and Cancers. In: *Indian Journal of Medical Microbiology* 23 (2), S. 74–79.
- Malvezzi, M.; Bertuccio, P.; Levi, F.; La Vecchia, C.; Negri, E. (2014): European cancer mortality predictions for the year 2014. In: *Annals of Oncology* 25 (8), S. 1650–1656.
- Matsushima, K.; Morishita, K.; Yoshimura, T.; Lavu, S.; Kobayashi, Y.; Lew, W. et. al. (1988): Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF by interleukin-1 and tumor necrosis factor. In: *Journal of Experimental Medicine* 167 (6), S. 1883–1893.
- McElnaym, P.; Lim, E. (2014): Adjuvant or neoadjuvant chemotherapy for NSCLC. In: *Journal of Thoracic Disease* 6 (S2), S. 224–227.
- Mian, B. M.; Dinney, C. P. N.; Bermejo, C. E.; Sweeney, P.; Tellez, C.; Yang, X. D. et al. (2003): Fully Human Anti-Interleukin 8 Antibody Inhibits Tumor Growth in Orthotopic Bladder Cancer Xenografts via Down-Regulation of Matrix Metalloproteases and Nuclear Factor- κ B. In: *Clinical Cancer Research* 9, S. 3167–3175.
- Middleton, J.; Neil, S.; Wintle, J.; Clark-Lewis, I.; Moore, H.; Lam, C. et al. (1997): Transcytosis and Surface Presentation of IL-8 by Venular Endothelial Cells. In: *Cell* 91, S. 385–395.
- Mitchell, J. A.; Paul-Clark, M. J.; Clarke, G. W.; McMaster, S. K.; Cartwright, N. (2007): Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. In: *Journal of Endocrinology* 193 (3), S. 323–330.
- Miyake, K.; Kaisho, T. (2014): Homeostatic inflammation in innate immunity. In: *Current Opinion in Immunology* 30, S. 85–90.
- Mok, T. S.; Wu, Y.-L.; Thongprasert, S.; Yang, C.-H.; Chu, D.-T.; Saijo N.; Sunpaweravong, P. (2009): Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. In: *The New England Journal of Medicine* 361 (10).
- Mok, T. S.K.; Lee, K.; Leung, L. (2014): Targeting Epidermal Growth Factor Receptor in the Management of Lung Cancer. In: *Seminars in Oncology* 41 (1), S. 101–109.

- Molina, J. R.; Yang, P.; Cassivi, S. D.; Schild, S. E.; Adjei, A. A. (2008): Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. In: *Mayo Clinic Proceedings* 83 (5), S. 584–594.
- Montalban, C.; Santón, A.; Redondo, C.; García-Cosío, M.; Boixeda, D.; Vazquez-Sequeiros, E. et al. (2005): Long-term persistence of molecular disease after histological remission in low-grade gastric MALT lymphoma treated with H. pylori eradication. Lack of association with translocation t(11;18): a 10-year updated follow-up of a prospective study. In: *Annals of Oncology* 16 (9), S. 1539–1544.
- Morath, S.; Geyer, A.; Spreitzer, I.; Hermann, C.; Hartung, T. (2002a): Structural Decomposition and Heterogeneity of Commercial Lipoteichoic Acid Preparations. In: *Infection and Immunity* 70 (2), S. 938–944.
- Morath, S.; Stadelmaier, A.; Geyer, A.; Schmidt, R. R.; Hartung, T. (2002b): Synthetic Lipoteichoic Acid from Staphylococcus aureus Is a Potent Stimulus of Cytokine Release. In: *Journal of Experimental Medicine* 195 (12), S. 1635–1640.
- Morath S.; Geyer, A.; Hartung, T. (2001): Structure-Function Relationship of Cytokine Induction by Lipoteichoic Acid from Staphylococcus aureus. In: *Journal of Experimental Medicine* 193 (3), S. 393–398.
- Murphy, C.; McGurk, M.; Pettigrew, J. et al. (2005): Nonapical and Cytoplasmic Expression of Interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 Correlates with Cell Proliferation and Nonapical and Cytoplasmic Expression of Interleukin-8, Microvessel Density in Prostate Cancer. In: *Clinical Cancer Research* 11 (11), S. 4117–4127.
- Naofumi M. (2003): Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. In: *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* 284 (4), S. L566–L577.
- Nickoloff, B. J.; Ben-Neriah, Y.; Pikarsky, E. (2005): Inflammation and Cancer: Is the Link as Simple as We Think? In: *The Journal of Investigative Dermatology* 124, S. 10–14.
- Ornatowska, M.; Azim, A. C.; Wang, X.; Christman, J. W.; Xiao, L.; Joo, M.; Sadikot, R. T. (2007): Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages. In: *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 293 (6), S. L1377–L1384.
- Park, B. S.; Lee, J.-O. (2013): Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. In: *Experimental & Molecular Medicine* 45 (12), S. 1–9.
- Paul-Clark, M. J.; McMaster, S. K.; Sorrentino, R.; Srisakandan, S.; Bailey, L. K.; Moreno, L. et al. (2009): Toll-like Receptor 2 Is Essential for the Sensing of Oxidants during

Inflammation. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 179 (4), S. 299–306.

Perlin, E.; Bang, K. M.; Shah, A.; Hursey, P. D.; Whittingham, W. L.; Hashmi, K. et al. (1990): The impact of pulmonary infections on the survival of lung cancer patients. In: *Cancer* 66 (3), S. 593–596.

Peveri, P.; Walz, A.; Dewald, B.; Baggiolini, M. (1988): A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. In: *Journal of Experimental Medicine* 167 (5), S. 1547–1559.

Phelps, R. M.; Johnson, B. E.; Ihde, D. C.; Gazdar, A. F.; Carbone, D. P.; McClintock, P. R. et al. (1996): NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line data base. In: *Journal of cellular biochemistry. Supplement.* 24, S. 32–91.

Pietrocola, G.; Arciola, C. R.; Rindi, S.; Di Poto, A.; Missineo, A.; Montanaro, L.; Speziale, P. (2011): Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. In: *IJAO* 34 (9), S. 799–810.

Pignon, J.-P.; Tribodet, H.; Scagliotti, G. V.; Douillard, J.-Y.; Shepherd, F. A.; Stephens, R. J. et al. (2008): Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation: A Pooled Analysis by the LACE Collaborative Group. In: *Journal of clinical oncology* 26 (21), S. 3552–3559.

Pinto, A.; Morello, S.; Sorrentino, R. (2011): Lung cancer and Toll-like receptors. In: *Cancer Immunology, Immunotherapy* 60 (9), S. 1211–1220.

Pirker, R.; Pereira, J. R.; Szczesna, A.; Pawel, J. von; Krzakowski, M.; Ramlau, R. et al. (2009): Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. In: *Lancet* 373, S. 1525–1531, zuletzt geprüft am 16.07.2015.

Pons, J.; Saulea, J.; Regueiro, V.; Santos, C.; López, M.; Ferrer, J. et al. (2006): Expression of Toll-like receptor 2 is up-regulated in monocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease. In: *Respiratory Research* 7:64, S. 1–9.

Porstmann, T.; Ternynck, T.; Avrameas, S. (1985): Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. In: *Journal of Immunological Methods* 82, S. 169–179.

Promega Corporation (2012): CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Instructions for use of products G5421, G5430, G5440, G1111 AND G1112. Technical Bulletin. Madison, USA.

- Pujol, F. H.; Devesa, M. (2005): Genotypic Variability of Hepatitis Viruses Associated With Chronic Infection and the Development of Hepatocellular Carcinoma. In: *Journal of Clinical Gastroenterology* 39 (7), S. 611–618.
- Putinati, S.; Trevisani, L.; Gualandi, M.; Guerra, G.; Rossi, M. R.; Sartori, S.; Potena, A. (1994): Pulmonary infections in lung cancer patients at diagnosis. In: *Lung Cancer* 11 (3-4), S. 243–249.
- Quinlan, D. C.; Davidson, A. G.; Summers, C. L.; Warden, H. F.; Doshi, H. M. (1992): Accumulation of p53 Protein Correlates with a Poor Prognosis in Human Lung Cancer. In: *Cancer Research* 52 (17), S. 4828–4831.
- R Development Core Team (2014): R: A language and environment for statistical computing. Wien, Österreich.
- Rafrafi, A.; Chahed, B.; Kaabachi, S.; Kaabachi, W.; Maalmi, H.; Hamzaoui, K.; Sassi, F. H. (2013): Association of IL-8 gene polymorphisms with non small cell lung cancer in Tunisia: A case control study. In: *Human Immunology* 74 (10), S. 1368–1374.
- Rakoff-Nahoum, S.; Medzhitov, R. (2009): Toll-like receptors and cancer. In: *Nature Reviews* 9 (1), S. 57–63.
- Rami-Porta, R.; Crowley, J. J.; Goldstraw, P. (2009): The Revised TNM Staging System for Lung Cancer. In: *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 15 (1), S. 4–9.
- Real, P. J.; Sierra, A.; Juan, A. de; Segovia, J. C.; Lopez-Vega, J. M.; Fernandez-Luna, J. L. (2002): Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. In: *Oncogene* 21 (50), S. 7611–7618.
- Reck, M.; Heigener, D. F.; Mok, T.; Soria, J.-C.; Rabe, K. F. (2013): Management of non-small-cell lung cancer: recent developments. In: *The Lancet* 382 (9893), S. 709–719.
- Rezania, S.; Amirmozaffari, N.; Rashidi, N.; Mirzadegan, E.; Zarei, S.; Ghasemi, J. et al. (2014): The same and not the same: heterogeneous functional activation of prostate tumor cells by TLR ligation. In: *Cancer Cell International* 14 (54), S. 1–14.
- Robert-Koch-Institut (2012): Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. Deutsche Daten im Rahmen der ersten europäischen Prävalenzerhebung zum Vorkommen nosokomialer Infektionen und zur Antibiotikaaanwendung. 26. Aufl. Berlin: Brandenburgische Universitätsdruckerei und Verlagsgesellschaft. In: *Epidemiologisches Bulletin*.
- Robert-Koch-Institut (2013a): Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von MRSA in Deutschland

- Update 2011/2012. Berlin: Brandenburgische Universitätsdruckerei und Verlagsgesellschaft. In: *Epidemiologisches Bulletin* (21).

Robert-Koch-Institut (2013b): Krebs in Deutschland 2009/2010. Berlin: Brandenburgische Universitätsdruckerei und Verlagsgesellschaft (9).

Robles, A. I.; Linke, S. P.; Harris, C. C. (2002): The p53 network in lung carcinogenesis. In: *Oncogene* (21), S. 6898–6907.

Roche Applied Science (2010): CASY Model TT – Cell Counter and Analyzer. Label-Free Viability Control and Cell Sizing. Penzberg.

Roche Applied Science (2013): Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric). Colorimetric immunoassay for the quantification of cell proliferation, based on the measurement of BrdU incorporation during DNA synthesis: A non-radioactive alternative to the [3H]-thymidine incorporation assay. Penzberg (Version 16).

Roche Innovatis AG (2002): CASY® Cell Counter + Analyser System Model TT. Operator Manual. Version 2.3E. Reutlingen.

Rockel, C.; Hartung, T. (2012): Systematic Review of Membrane Components of Gram-Positive Bacteria Responsible as Pyrogens for Inducing Human Monocyte/Macrophage Cytokine Release. In: *Front. Pharmacol.* 3.

Rode, H.-J. (2008): Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation. 4th edition. Mannheim.

Rolston, K. V. I. (2001): The spectrum of pulmonary infections in cancer patients. In: *Current Opinion in Oncology* (13), S. 218–223.

Ruan, S.; Li, R.; Han, Q.; Liu, J.; Li, G.; Song, Y. (2014): Expression and clinical significance of Semaphorin4D in non-small cell lung cancer and its impact on malignant behaviors of A549 lung cancer cells. In: *Journal of Huazhong University of Science and Technology (Medical Sciences)* 34 (4), S. 491–496.

Sakamoto, M.; Mikasa, K.; Majima, T.; Hamada, K.; Konishi, M.; Maeda, K. et al. (2001): Anti-cachectic effect of clarithromycin for patients with unresectable non-small cell lung cancer. In: *Chemotherapy* 47 (6), S. 444–451.

Samara, K.; Antoniou, K. M.; Karagiannis, K.; Margaritopoulos, G.; Lasithiotaki, I.; Koutala, E.; Siafakas, N. M. (2012): Expression profiles of Toll-like receptors in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis. In: *Int J Oncol* 40, S. 1397–1404.

Sarir, H.; Henricks, P. A. J.; van Houwelingen, A. H.; Nijkamp, F. P.; Folkerts, G. (2008): Cells, mediators and Toll-like receptors in COPD. In: *European Journal of Pharmacology* 585 (2-3), S. 346–353.

- Schneewind, O.; Missiakas, D. (2014): Lipoteichoic Acids, Phosphate-Containing Polymers in the Envelope of Gram-Positive Bacteria. In: *Journal of Bacteriology* 196 (6), S. 1133–1142.
- Schön, M. P.; Schön, M. (2006): The small-molecule immune response modifier imiquimod – its mode of action and clinical use in the treatment of skin cancer. In: *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 10 (1), S. 69–76.
- Schröder, N. W. J.; Morath, S.; Alexander, C.; Hamann, L.; Hartung, T.; Zahringer, U. et al. (2003): Lipoteichoic Acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* Activates Immune Cells via Toll-like Receptor (TLR)-2, Lipopolysaccharide-binding Protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 Are Not Involved. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (18), S. 15587–15594.
- Schwandner, R.; Dziarski, R.; Wesche, H.; Rothe, M.; Kirschning, C. J. (1999): Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like Receptor 2. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (25), S. 17406–17409.
- Sha, Q.; Truong-Tran, A. Q.; Plitt, J. R.; Beck, L. A.; Schleimer, R. P. (2004): Activation of Airway Epithelial Cells by Toll-Like Receptor Agonists. In: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 31 (3), S. 358–364.
- Shang, L.; Daubeuf, B.; Triantafyllou, M.; Olden, R.; Depis, F.; Raby, A.-C. et al. (2014): Selective Antibody Intervention of Toll-like Receptor 4 Activation through Fc Receptor Tethering. In: *Journal of Biological Chemistry* 289 (22), S. 15309–15318.
- Shaulian, E.; Karin, M. (2002): AP-1 as a regulator of cell life and death. In: *Nature Cell Biology* 4, S. E131-E136.
- Shepherd, F. A.; Pereira, J. R.; Ciuleanu, T.; Tan, E. H.; Hirsh, V.; Thongprasert Sumitra, Campos Daniel, Maoleekoonpiroj Savitree, Smylie Michael, Martins Renato, van Kooten Maximiliano, Dediu Mircea, Findlay Brian, Tu Dongsheng, Johnston Dianne, Bezjak Andrea, Clark Gary, Santabárbara Pedro, Seymour Lesley (2005): Erlotinib in Previously Treated Non–Small-Cell Lung Cancer. In: *The New England Journal of Medicine* 353 (2), S. 123–132.
- Shi, Q.; Abbruzzese, J. L.; Huang, S.; Fidler, I. J.; Xiong, Q.; Xie, K. (1999): Constitutive and Inducible Interleukin 8 Expression by Hypoxia and Acidosis Renders Human Pancreatic Cancer Cells More Tumorigenic and Metastatic. In: *Clinical Cancer Research* 5 (11), S. 3711–3721.
- Siegel, R.; Ma, J.; Zou, Z.; Jemal, A. (2014): Cancer statistics, 2014. In: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 64 (1), S. 9–29.

- Singh, R. K.; Gutman, M.; Radinsky, R.; Bucana, C. D.; Fidler, I. J. (1994): Potential of Human Melanoma Cells in Nude Mice Expression of Interleukin 8 Correlates with the Metasta. In: *Cancer Research* 54, S. 3242–3247.
- Smith, D. R.; Polverini, P. J.; Kunkel, S. L.; Orringer, M. B.; Whyte, R. I.; Burdick, M. D. et. al. (1994): Inhibition of Interleukin 8 Attenuates Angiogenesis in Bronchogenic Carcinoma. In: *Journal of Experimental Medicine* 179, S. 1409–1415.
- Smith, J. S.; Kumlin, U.; Nyberg, F.; Fortes, C.; Zaridze, D.; Ahrens, W. et al. (2008): Lack of association between serum antibodies of Chlamydia pneumoniae infection and the risk of lung cancer. In: *International Journal of Cancer* 123 (10), S. 2469–2471.
- Soong, G.; Reddy, B.; Sokol, S.; Adamo, R.; Prince, A. (2004): TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. In: *Journal of Clinical Investigation* 113 (10), S. 1482–1489.
- Sparmann, A.; Bar-Sagi, D. (2004): Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. In: *Cancer Cell* 6 (5), S. 447–458.
- Spiro, S. G.; Gould, M. K.; Colice, G. L. (2007): Initial Evaluation of the Patient With Lung Cancer: Symptoms, Signs, Laboratory Tests, and Paraneoplastic Syndromes. ACCP Evidenced-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition). In: *Chest* 132 (3), S. 149–160.
- Strauss, G. M.; Herndon, J. E.; Maddaus, M. A.; Johnstone, D. W.; Johnson, E. A.; Harpole, D. H. et al. (2008): Adjuvant Paclitaxel Plus Carboplatin Compared With Observation in Stage IB Non-Small-Cell Lung Cancer: CALGB 9633 With the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. In: *Journal of clinical oncology* 26 (31), S. 5043–5051.
- Stuart, L. M.; Deng, J.; Silver, J. M.; Takahashi, K.; Tseng, A. A.; Hennessy, E. J. et al. (2005): Response to Staphylococcus aureus requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. In: *The Journal of Cell Biology* 170 (3), S. 477–485.
- Sun, Q.; Sun, F.; Wang, B.; Liu, S.; Niu, W.; Liu, E. et al. (2014): Interleukin-8 promotes cell migration through integrin $\alpha\beta6$ upregulation in colorectal cancer. In: *Cancer Letters*.
- Symonds, J. M.; Ohm, A. M.; Carter, C. J.; Heasley, L. E.; Boyle, T. A.; Franklin, W. A.; Reyland, M. E. (2011): Protein Kinase C Is a Downstream Effector of Oncogenic K-ras in Lung Tumors. In: *Cancer Research* 71 (6), S. 2087–2097.

- Tang, C.-H.; Hsu, C.-J.; Yang, W.-H.; Fong, Y.-C. (2010): Lipoteichoic acid enhances IL-6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, PKC δ and c-Src dependent pathways. In: *Biochemical Pharmacology* 79 (11), S. 1648–1657.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2011): Thermo Scientific Pierce Assay Development Technical Handbook. Version 2.
- Thomas, L. W.; Lam, C.; Edwards, S. W. (2010): Mcl-1; the molecular regulation of protein function. In: *FEBS Letters* 584 (14), S. 2981–2989.
- Tian, Y.; Zhang, X.; Zhang, K.; Song, Z.; Wang, R.; Huang, S., Lin, Z. (2013): Effect of *Enterococcus faecalis* Lipoteichoic Acid on Apoptosis in Human Osteoblast-like Cells. In: *Journal of Endodontics* 39 (5), S. 632–637.
- Tibaldi, C.; Vasile, E.; Bernardini, I.; Orlandini, C.; Andreuccetti, M.; Falcone, A. (2008): Baseline elevated leukocyte count in peripheral blood is associated with poor survival in patients with advanced non-small cell lung cancer: a prognostic model. In: *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 134 (10), S. 1143–1149.
- Tilahun, A. Y.; Karau, M.; Ballard, A.; Gunaratna, M. P.; Thapa, A.; David, C. S. et al. (2014): The Impact of *Staphylococcus aureus*-Associated Molecular Patterns on Staphylococcal Superantigen-Induced Toxic Shock Syndrome and Pneumonia. In: *Mediators of Inflammation* (4), S. 1–13.
- Travis, W. D.; Brambilla, E.; Müller-Hermelink, H. K.; Harris, C. C. (2004): Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon: IARC Press (World Health Organization classification of tumours, 7).
- Triantafyllou, M.; Gamper, F. G. J.; Haston, R. M.; Mouratis, M. A.; Morath, S.; Hartung, T.; Triantafyllou, K. (2006): Membrane Sorting of Toll-like Receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 Heterodimers at the Cell Surface Determines Heterotypic Associations with CD36 and Intracellular Targeting. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (41), S. 31002–31011.
- Tsai, A.-C.; Pai, H.-C.; Wang, C.-Y.; Liou, J.-P.; Teng, C.-M.; Wang, J.-C.; Pan, S.-L. (2014): In vitro and in vivo anti-tumour effects of MPT0B014, a novel derivative aroylquinoline, and in combination with erlotinib in human non-small-cell lung cancer cells. In: *British Journal of Pharmacology* 171 (1), S. 122–133.
- Tsai, C.-M.; Chang, K.-T.; Wu, L.-H.; Chen, J.-Y.; Gazdar, A. F.; Mitsudomi, T. et al. (1996): Correlations p53 Gene Mutations, and Cell Proliferation Characteristics in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines. In: *Cancer Research* (56), S. 206–209.
- Tsim, S.; O'Dowd, C. A.; Milroy, R.; Davidson, S. (2010): Staging of non-small cell lung cancer (NSCLC): A review. In: *Respiratory Medicine* 104 (12), S. 1767–1774.

- Valenzuela, D. M.; Groffen, J. (1986): Four human carcinoma cell lines with novel mutations in position 12 of c-K-ras oncogene. In: *Nucleic Acids Research* 14 (2), S. 843–852.
- van Langevelde, P.; van Dissel, J. T.; Ravensbergen, E.; Appenmelk, B. J.; Schrijver, I. A.; Groeneveld, P. H. P. (1998): Antibiotic-Induced Release of Lipoteichoic Acid and Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*: Quantitative Measurements and Biological Reactivities. In: *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 42 (12), S. 3073–3078.
- Vansteenkiste, J.; Ruyscher, D. de; Eberhardt, W. E. E.; Lim, E.; Senan, S.; Felip, E.; Peters, S. (2013): Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. In: *Annals of Oncology* 24 (Supplement 6), S. vi89-vi98.
- Vermeulen, L.; Wilde, G. D.; Notebaert, S.; Berghe, W. V.; Haegeman, G. (2002): Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor- κ B p65 subunit. In: *Biochemical Pharmacology* 64 (5-6), S. 963–970.
- Walger, P.; Popp, W.; Exner, M. (2013): Stellungnahme der DGKH zu Prävalenz, Letalität und Präventionspotenzial nosokomialer Infektionen in Deutschland 2013. In: *Hygiene & Medizin* 38 (7/8), S. 329–338.
- Wang, R.; Zhang, J.; Chen, S.; Lu, M.; Luo, X.; Yao, S. et al. (2011): Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression. In: *Lung Cancer* 74 (2), S. 188–196.
- Wang, Y.; Broderick, P.; Webb, E.; Wu, X.; Vijayakrishnan, J.; Matakidou, A. et al. (2008): Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. In: *Nature Genetics* 40 (12), S. 1407–1409.
- Wang, Y.; Tu, Q.; Yan, W.; Xiao, D.; Zeng, Z.; Ouyang, Y. et al. (2015): CXC195 suppresses proliferation and inflammatory response in LPS-induced human hepatocellular carcinoma cells via regulating TLR4-MyD88-TAK1-mediated NF- κ B and MAPK pathway. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 456 (1), S. 373–379.
- Wardenburg, J. B.; Patel, R. J.; Schneewind, O. (2007): Surface Proteins and Exotoxins Are Required for the Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Pneumonia. In: *Infection and Immunity* 75 (2), S. 1040–1044.

- Wollenberger, U.; Renneberg, R.; Bier, F. F.; Scheller, F. W. (2012): Analytische Biochemie: Eine praktische Einführung in das Messen mit Biomolekülen. Weinheim an der Bergstraße: Wiley-VCH.
- Xing, J.; Moldobaeva, N.; Birukova, A. A. (2011): Atrial natriuretic peptide protects against Staphylococcus aureus-induced lung injury and endothelial barrier dysfunction. In: *Journal of Applied Physiology* 110, S. 213–224.
- Yao, C.; Lin, Y.; Chua, M.-S.; Ye, C.-S.; Bi, J.; Li, W. et al. (2007): Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells. In: *International Journal of Cancer* 121 (9), S. 1949–1957.
- Yoshida, S.; Ono, M.; Shono, T.; Izumi, H.; Ishibashi, T.; Suzuki, H.; Kuwano, M. (1997): Involvement of Interleukin-8, Vascular Endothelial Growth Factor, and Basic Fibroblast Growth Factor in Tumor Necrosis Factor Alpha-Dependent Angiogenesis. In: *Molecular and Cellular Biology* 17 (7), S. 4015–4023.
- Yuan, A.; Yang, P.-C.; Yu, C.-J.; Chen, W.-J.; Lin, F.-Y.; Kuo, S.-H.; Luh, K.-T. (2000): Interleukin-8 Messenger Ribonucleic Acid Expression Correlates with Tumor Progression, Tumor Angiogenesis, Patient Survival, and Timing of Relapse in Non-Small-Cell Lung Cancer. In: *Am J Respir Crit Care Med* (162), S. 1957–1963.
- Yuan, A.; Yu, C.-J.; Luh, K.-T.; Kuo, S.-H.; Lee, Y.-C.; Yang, P.-C. (2002): Aberrant p53 Expression Correlates With Expression of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA and Interleukin-8 mRNA and Neoangiogenesis in Non-Small-Cell Lung Cancer. In: *Journal of clinical oncology* 20 (4), S. 900–910.
- Yuan, Z.; Mehta, H. J.; Mohammed, K.; Nasreen, N.; Roman, R.; Brantly, M.; Sadikot, R. T. (2014): TREM-1 Is Induced in Tumor Associated Macrophages by Cyclo-Oxygenase Pathway in Human Non-Small Cell Lung Cancer. In: *PLOS ONE* 9 (5).
- Zähringer, U.; Lindner, B.; Inamura, S.; Heine, H.; Alexander, C. (2008): TLR2 – promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. In: *Immunobiology* 213 (3-4), S. 205–224.
- Zanoni, I.; Ostuni, R.; Marek, L. R.; Barresi, S.; Barbalat, R.; Barton, G. M. et al. (2011): CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-like Receptor 4. In: *Cell* 147 (4), S. 868–880.
- Zhan, P.; Suo, L.; Qian, Q.; Shen, X.; Qiu, L.; Yu, L.; Song, Y. (2011): Chlamydia pneumoniae infection and lung cancer risk: A meta-analysis. In: *European Journal of Cancer* 47 (5), S. 742–747.

Zhang, L.; Ruan, J.; Yan, L.; Li, W.; Wu, Y.; Tao, L. et al. (2012): Xanthatin Induces Cell Cycle Arrest at G2/M Checkpoint and Apoptosis via Disrupting NF- κ B Pathway in A549 Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. In: *Molecules* 17 (12), S. 3736–3750.

Zhang, Y.-B.; He, F.-L.; Fang, M.; Hua, T.-F.; Hu, B.-D.; Zhang, Z.-H. et. al. (2009): Increased expression of Toll-like receptors 4 and 9 in human lung cancer. In: *Molecular Biology Reports* 36 (6), S. 1475–1481.

Zhu, Y. M.; Webster, S. J.; Flower, D.; Woll, P. J. (2004): Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells. In: *British Journal of Cancer* 91 (11), S. 1970–1976.

9 Publikationen

Hattar, Katja; Reinert, Christian Philipp; Sibelius, Ulf; Goekyildirim, Mira Yasemin; Subtil, Florentine Susanne Barbara; Wilhelm, Jochen; Eul, Bastian; Dahlem, Gabriele; Grimminger, Friedrich; Seeger, Werner; Grandel, Ulrich (2017): *Lipoteichoid acids from S. aureus stimulate proliferation of NSCLC cells in vitro*.

In: Cancer Immunology, Immunotherapy. doi: 10.1007/s00262-017-1980-4

Wissenschaftliche Posterdemonstration:

Reinert, Christian Philipp; Hattar, Katja; Dahlem, Gabriele; Ziegler, Susanna; Wilhelm, Jochen; Sibelius, Ulf; Seeger, Werner; Grimminger, Friedrich; Grandel, Ulrich: *Einfluss von Lipoteichonsäuren (LTA) von Staphylococcus aureus auf die Proliferation von NSCLC-Zelllinien*. Deutscher Kongress für Innere Medizin (DGIM), Wiesbaden 2014.

11 Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Heidelberg, den 15.07.2016

Ort, Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Grimminger, Herrn Professor Sibelius sowie Herrn Professor Seeger für die Bereitstellung der materiellen und räumlichen Voraussetzungen zur Durchführung der experimentellen Arbeit danken. Der Emil von Behring und Wilhelm-Conrad Röntgen Stiftung danke ich vielmals für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

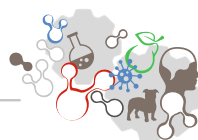
Frau Dr. med. Katja Hattar und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Grandel möchte ich besonders danken für die Vergabe des Promotionsthemas, das entgegengebrachte Vertrauen sowie die zuverlässige und freundliche wissenschaftliche Betreuung und Beratung.

Weiterhin möchte ich mich sehr bei Frau Gabriele Dahlem und Frau Susanna Ziegler bedanken, die mir bei Fragen und Problemen während der experimentellen Arbeit im Labor stets hilfsbereit zur Seite standen. Herrn Dr. Jochen Wilhelm danke ich für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Versuche.

13 Lebenslauf

Christian Philipp Reinert

- Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt -



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6557-7



9 783835 196557